Aus dem Institut
für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf

# Zu den biochemischen Eigenschaften des Antithrombin III

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Heinrich Rustige

~~1982~~
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0070

Aus dem Institut
für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf

# Zu den biochemischen Eigenschaften des Antithrombin III

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Heinrich Rustige
1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. H. Trobisch

Koreferent
gez.: Priv.- Doz. Dr. Richter

Meinem verehrten Lehrer
Herrn Prof. Dr. med. Heiner Trobisch
möchte ich für seine freundliche Unterstützung, seine
fördernden Anregungen und sein Interesse an meiner
Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


| | | |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Historische Übersicht | 1 |
| 1.1.1 | Entwicklung der Isolierung von Antithrombin III | 1 |
| 1.2 | Definierung der verwendeten Einheiten | 3 |
| 1.3 | Faktor X | 4 |
| 1.4 | Hemmung der Serylproteasen durch Antithrombin III | 5 |
| 2. | Material | 8 |
| 3. | Methoden | 11 |
| 3.1 | Affinitätschomatographie | 11 |
| 3.1.1 | Versuchsaufbau | 11 |
| 3.1.2 | Versuchsablauf | 11 |
| 3.2 | Gelchromatographie | 11 |
| 3.3 | Chromatofocusing | 12 |
| 3.4 | High Pressure Liquid Chromatography ( HPLC ) | 12 |
| 3.5 | Polyacrylamid- Gelelektrophorese | 13 |
| 3.6 | SDS- Gelelektrophorese | 13 |
| 3.7 | Konzentrationsbestimmung von AT III, Albumin und beta- Lipoprotein mit radialer Immundiffusion | 14 |
| 3.8 | Bestimmung der AT III- Aktivität | 15 |
| 3.9 | Nachweis von Faktor Xa mit S- 2222 | 15 |
| 3.10 | Nachweis von Thrombin mit S- 2238 | 15 |
| 3.11 | Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration | 15 |
| 3.12 | Aminosäurenanalyse von AT III | 16 |
| 3.13 | Gelscanning von Faktor Xa | 16 |
| 3.14 | Differenz- Mikrokalorimetrie | 17 |
| 4. | Ergebnisse | |
| 4.1 | Isolierung von Antithrombin III mit Heparin-Sepharose | 18 |

| | | |
|---|---|---|
| 4.1.1 | Isolierung aus handelsüblichen AT III-Konzentraten | 18 |
| 4.1.1.1 | Desorption von AT III mit Natriumchlorid | 18 |
| 4.1.1.2 | AT III- Desorption mit anderen Puffern | 21 |
| 4.1.1.2.1 | Desorption mit Natriumchlorid | 23 |
| 4.1.1.2.2 | Desorption mit Lysin | 23 |
| 4.1.1.2.3 | Desorption mit beta- Alanin | 23 |
| 4.1.1.2.4 | Desorption mit Diäthanolamin | 23 |
| 4.1.1.2.5 | Desorption mit Triäthanolamin | 24 |
| 4.1.1.3 | Molekulargewichtbestimmung mit Gelchromatographie | 25 |
| 4.1.2 | Isolierung von AT III aus Plasma | 26 |
| 4.1.2.1 | Charakterisierung des AT III mit PAA-Elektrophorese | 29 |
| 4.1.2.2 | Charakterisierung des AT III mit Chromatofocusing | 30 |
| 4.1.2.3 | Charakterisierung des AT III mit HPLC | 31 |
| 4.1.2.4 | Aminosäurentotalanalyse des AT III | 32 |
| 4.1.2.5 | Spezifische Extinktion des AT III | 33 |
| 4.2 | Isolierungsversuch von Faktor Xa und Thrombin | 34 |
| 4.2.1 | Gelchromatographie des Faktor Xa | 34 |
| 4.2.1.1 | Faktor Xa auf Sepharose CL-6B | 34 |
| 4.2.1.2 | Faktor Xa auf Bio- Gel P-200 | 35 |
| 4.2.2 | Gelscanning des Faktor Xa | 35 |
| 4.2.3 | Reinigung von Thrombin auf Sephadex G-100 | 35 |
| 4.3 | Interaktion zwischen AT III und Faktor Xa sowie Thrombin | 36 |
| 4.3.1 | Gelchromatographie mit in vitro Kombination von AT III und Faktor Xa | 36 |
| 4.3.2 | Affinitätschromatographie mit in vitro Kombination von AT III und Faktor Xa | 37 |
| 4.3.3 | Hemmversuche mit in vitro Kombinationen von AT III mit Faktor Xa sowie Thrombin | 40 |
| 4.3.3.1 | PAA- Elektrophoresen | 40 |
| 4.3.3.2 | SDS- Elektrophoresen | 43 |
| 4.3.4 | Mikrokalorimetrische Versuche mit der in vitro Kombination von AT III und Faktor Xa | 44 |
| 5. | Diskussion | 47 |

| | | |
|---|---|---|
| 5.1 | Isolierung von AT III mit der Affinitäts-chromatographie | 47 |
| 5.1.1 | AT III- Chromatographie auf Heparin- Sepharose | 47 |
| 5.1.2 | Isolierung von AT III aus Plasma | 49 |
| 5.1.3 | Physikochemische Charakterisierung des AT III mittels Aminosäurentotalanalse | 51 |
| 5.2 | Konzentrationsbestimmungen des AT III | 53 |
| 5.3 | Interaktion von Faktor Xa mit AT III | 54 |
| 5.4 | Thermodynamische Untersuchungen bei der Komplex-bildung von AT III und Faktor Xa | 57 |
| 5.5 | Theorie der Wechselwirkung zwischen AT III und Heparin | 58 |
| 5.6 | Einfluß der Serylproteasen auf die AT III-Heparin- Bindung | 60 |
| 6. | Zusammenfassung | 61 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 63 |

# Einleitung

## Historische Übersicht

Nach der Entdeckung gerinnungshemmender Faktoren im Blut um die Jahrhundertwende (1,2,3) stellte sich die Frage nach deren Funktion und Aufgabe.
Für Versuche zu diesen Fragestellungen war es zunächst erforderlich, diese 'Faktoren' in genügender Konzentration zu isolieren. Mit der fortschreitenden Entwicklung biochemischer Trennungs- und Nachweisverfahren fanden sich immer bessere und auch einfachere Isolierungsverfahren für AT III.
Chromatographische Trennungsverfahren nahmen ihren Anfang mit der Ionenaustauschchromatographie in den 30er Jahren, wobei Proteine nach Ladung getrennt wurden. Zu Beginn der 60er Jahre wurde die Gelfiltration eingeführt, welche Proteine abhängig von der Molekülgröße isoliert. Etwa 1970 kam die Affinitätschromatographie auf. Dabei werden Proteine nach ihrer Biospezifität unterschieden. Seit einem Jahr etwa gibt es das Chromatofocusing, eine Chromatographie, welche Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt unterscheidet.
Alle Methoden eignen sich für analytische und präparative Anwendungen.

### Entwicklung der Isolierung von Antithrombin III

Howell und Holt (3) beschrieben 1918 zwei gerinnungshemmende Substanzen des Blutes: Antithrombin und Heparin. Danach wird pro- Antithrombin durch Heparin zu Antithrombin aktiviert.
Quick fand 1938 (4), daß die Antithrombinwirkung an die Serumalbuminfraktion gebunden ist und daß die Wirkung des Heparin von dieser Fraktion abhängig ist.

Brinkhous (5) kam 1939 zu dem Ergebnis, daß ein von ihm gefundener Plasmafaktor Prothrombin zu Thrombin umwandelt und diese Reaktion durch Heparin beschleunigt wird. Er stellte die Hypothese auf, daß dieser Heparin-Kofaktor mit dem pro- Antithrombin von Howell identisch ist.

Zur Aufklärung mußten Methoden gefunden werden, mit denen man diese Proteine isolieren und in ausreichender Konzentration vorliegen haben konnte.

1955 gelang Monkhouse (6) eine Anreicherung von AT III-Aktivität und Heparin- Kofaktor- Aktivität mit der Adsorption von Plasma an Aluminiumhydroxid. Beide Aktivitäten waren nicht trennbar. Monkhouse beschreibt sechs Antithrombinwirkungen des Plasmas.

1967 gewann Abildgaard (7) mittels Gelfiltration und Ultrazentrifugation zwei gerinnungshemmende Fraktionen aus Plasma. Zur weiteren Reinigung verwandte er noch die Ionenaustauschchromatographie. Abildgaard unterschied die beiden Fraktionen in AT III- und Heparin- Kofaktor-Aktivität. 1968 beschrieb Abildgaard (8) eine Verbesserung seiner AT III- Gewinnung. Er schloß noch eine Gelelektrophorese an. Danach fanden sich die AT III- und die Heparin- Kofaktor- Aktivität an eine Fraktion gebunden.

1973 beschrieb Rosenberg (9) eine Methode zur AT III-Gewinnung, welche eine homogene Substanz lieferte. Die Methode umfaßte sechs Schritte unter Verwendung von Aluminiumhydroxidadsorption, Sephadex G-200 Gelfiltration, DEAE- Sephadex- Chromatographie, DEAE- Cellulose-Chromatographie und Isoelektrofokussierung. Es zeigte sich, daß AT III- und Heparin- Kofaktor- Aktivität an ein Molekül gebunden waren.

1974 stellte Miller- Andersen (10) eine einfachere Methode vor. Die Isolierung erfolgte mit Heparin- Sepharose (Affinitätschromatographie). Eine weitere Fraktionierung erfolgte mit DEAE- Sephadex und Sepharose G-200 Gelfiltration mit einem gereinigtem AT III als

Ergebnis.
1980 änderte Murano (11) diese Methode, indem er zwei Affinitätschromatographien auf Heparin- Sepharose hintereinader anwandte. Er erhielt mit diesen zwei Schritten ein hoch gereinigtes AT III.

## 1.2 Definierung der verwendeten Einheiten

Zur quantitativen Erfassung von Antithrombin III bestehen verschiedene Maßeinheiten. Von der WHO wird eine Einheit (1 U = 1 WHO U) als die Aktivität festgelegt, die durchschnittlich in einem Milliliter frischen, humanen Citratplasma von gesunden Spendern enthalten ist, entsprechend 100 % Aktivität. Handelsübliche AT III-Konzentrate (siehe 2.4 und 2.5) werden unter Angabe dieser Einheiten geliefert.
Bei den Versuchen wurden mit dem AT III- Testkit von Boehringer (Methode siehe 3.8) AT III- Aktivtäten bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind als Inhibitoreinheiten (IU = Inhibitor Units) angegeben. 1 IU AT III ist die Aktivität, die unter Standardbedingungen (chromogenes Substrat, 25° C) 1 WHO U Thrombin inaktiviert.
Zur Umrechnung von einer WHO U AT III in eine IU AT III und umgekehrt gilt folgender Zusammenhang:

12 IU AT III = 1 WHO U AT III

Konzentrationsbestimmungen von AT III wurden u.a. mit radialer Immundiffusion durchgeführt (zur Methode siehe 3.7). Die vorhandenen und auch selbst erstellten Eichkurven mit Standard- Human- Plasma (Behring) waren nur gültig für AT III in Plasma. Dabei war dann eine Angabe in Gramm pro Liter möglich. Sobald gereinigtes AT III untersucht wurde, ergaben sich falsche Werte (siehe Diskussion 5.2). Als Folge dieses Ergebnisses konnten die

Konzentrationsangaben dieser Proben nicht in g/l, sondern nur in arbitrarischen Einheiten angegeben werden. Diese entsprechen dem Quadrat der Präzipitatringdurchmesser in Millimeter bei der radialen Immundiffusion.

Die quantitative Erfassung des Faktor Xa erfolgt in Nanokatal. Ein Nanokatal (nkat) ist die Menge eines Enzyms, welche einmMol Substrat pro Sekunde unter optimalen Bedingungen umsetzt.

Heparin wird in Intenationalen Einheiten ( U ) gemessen. Eine Einheit entspricht der spezifischen Wirkung von 7.7 µg des internationalen Standardpräparates.

## 1.3 Faktor X

Faktor X ist ein Zymogen der Gerinnungskette, welches ebenso wie die Faktoren II, VII und IX in der Leber synthetisiert wird. Die Synthese ist abhängig von der Anwesenheit von Vitamin K. Durch limitierte Proteolyse erfolgt die Umwandlung in das aktive Enzym Faktor Xa. Faktor X ist gemeinsames Substrat der Serylproteasen Faktor IXa und Faktor VIIa. Die Aktivierung des Faktor X erfolgt innerhalb des exogenen Gerinnungssystems durch Faktor VIIa und beim endogenen Gerinnungssystem durch den Faktor IXa - Faktor VIIIa - Komplex. Bei beiden Vorgängen sind die Reaktanten über Kalziumionen an einer Phospholipidmembran gebunden. Faktor X hat mindestens drei Bindungsstellen für Kalziumionen. Diese Ionen bewirken am Faktor X eine Konformationsänderung, wodurch die Aktivierung zu Faktor Xa erleichtert wird.
Humaner Faktor X hat ein Molekulargewicht von 75 000. Er besteht aus einer Peptidkette, die während des Aktivierungsprozesses in eine schwere und eine leichte Kette gespalten wird. Dabei erfolgt ein Verlust der Molmasse durch Verlust der sogenannten Aktivierungspeptide, so

daß Faktor Xa ein Molekulargewicht von ca. 56 000 hat. Dies trifft für die Vorgänge in vivo zu, nicht aber für die Aktivierung von Faktor X durch RVV (Russel's Viper Venom) in vitro (12).

## 1.4 Hemmung der Serylproteasen durch Antithrombin III

Neben den Gerinnungsfaktoren des Blutes gibt es auch gerinnungshemmende Faktoren, die man als Antithrombine bezeichnet. 1955 wurden von Monkhouse (6) sechs Antithrombine beschrieben. Heute weiß man, daß nur das Antithrombin III als einzelnes gerinnungshemmendes Protein existiert, welches in die Gerinnungskaskade eingreift. Antithrombin II, der Heparin- Kofaktor, ist nach Abildgaard (7) mit dem AT III identisch. Die anderen Antithrombine sind gerinnungshemmende Phänomene, die für die Thrombinhemmung keine physiologische Bedeutung haben. Antithrombin III wirkt an folgenden Punkten des Gerinnungssystems:

es hemmt die Aktivierung des Faktor X zu Faktor Xa
es hemmt die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin
es hemmt die Fibrinogenspaltung durch Thrombin
es hemmt die Aktivierung des Faktor XIII durch Thrombin
es hemmt die Faktoren IXa, XIa und XIIa des endogenen Gerinnungsystems

AT III bindet sich bimolekular an die Faktoren IIa, IXa, Xa, XIa und XIIa, sowie an Plasmin und Kallikrein (13,14). Bei der Interaktion von Faktor Xa und AT III läuft folgender Vorgang ab, der allgemein auch für andere Serylproteasen gültig ist. Faktor Xa ist als Enzym, Faktor II als dessen Substrat und AT III als Inhibitor des Faktor Xa aufzufassen. Die Reaktion des AT III mit einem Gerinnungsfaktor ist ein langsamer Prozeß, der u.U. auch reversibel sein kann:

$$AT\ III + Fa \underset{k_i}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} [AT\ III \cdot Fa]$$

Bei der Komplexbildung zwischen Inhibitor und Serylprotease kann Heparin als Katalysator beschleunigend wirken. Heparin erhöht beim AT III die Affinität zu diesen Enzymen ohne die Hemmkapazität zu steigern. AT III bindet sich mit höherer Geschwindigkeit an Thrombin als an Faktor Xa oder Plasmin. Die Reaktion zwischen dem Enzym und dem Substrat läuft insgesamt über drei Stufen ab, wovon der erste Schritt reversibel ist, die Acylierung und die Desacylierung (Schritt zwei und drei) aber nur in einer Richtung ablaufen:

$$E + S \underset{k_4}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [E \cdot S] \xrightarrow{k_2} [E \cdot P_2] + P_1 \xrightarrow{k_3} E + P_2 + P_1$$

Bei den Serylproteasen fungiert die Hydroxymethylgruppe des Serins als Protonenrelais des aktiven Zentrums. Die in der Nähe des aktiven Zentrums befindlichen Aminosäuren Asparagin und Histidin sind tentative Aminosäuren. Sie richten die Hydroxymethylgruppe des Serins auf die zu spaltene Carbamylbindung zwischen Arginin und Valin im Substrat (tetraedrische Transformation).
Im zweiten Schritt folgt eine Acylierung zwischen dem Serin des Enzyms und dem Arginin des Substrats unter Abspaltung des Valin und der folgenden Aminosäurenkette vom Substrat. Die jetzt bestehende Verbindung wird durch Anlagerung von einem Molekül Wasser gespalten (Desacylierung). Das Enzym wird wieder freigesetzt.

Die Energiebilanz der gesamten Reaktion ist gleich Null. Die einzelnen Schritte der Umwandlung unterscheiden sich jedoch energetisch.

AT III kann diesen Vorgang kompetitiv hemmen, indem es wie das Substrat mit der Serylprotease reagiert. AT III hat ebenso wie das Substrat eine ARG- VAL- Brücke als reaktives Zentrum, macht aber bei der Reaktion eine Konformationsänderung durch, die die Desacylierung unmöglich macht. Die durch Acylierung entstandene Verbindung wird so in das Innere des Komplexes gezogen, daß die Wasseranlagerung, welche zur Spaltung des Komplexes nötig wäre, nicht erfolgen kann. Der Komplex bleibt stabil und das Enzym ist inaktiviert (15).

über die Wirkung des Heparin bei der Interaktion des AT III und der Serylproteasen bestehen unterschiedliche Theorien. Heparin hat zu Faktor Xa die höchste Affinität. Die Inaktivierung von Thrombin durch AT III wird von Heparin am stärksten beschleunigt (im Vergleich zu Faktor Xa oder Plasmin).

Nach Rosenberg (9) besitzt AT III neben seinem aktiven Zentrum noch Lysinreste, welche als Heparinbindungsstelle dienen. Durch die Bindung des Heparins wird die Konformation des AT III so verändert, daß die Affinität des AT III zu den Serylproteasen erheblich zunimmt. AT III besitzt demnach getrennte Bindungsstellen für Heparin und Serylproteasen.

Nach Stürzebecher (16) hat Heparin Affinität zu AT III und zu den Serylproteasen, die Katalysatorwirkung erfolgt jedoch durch Bindung an die Serylproteasen. Durch Konformationsänderung der Serylproteasen erhöht sich dann deren Affinität zum AT III.

## 2. Material

2.1 Agarose A 37 (Indubiose); PHARMINDUSTRIE, Clichy, Frankreich

2.2 Ampholine PAGplates; LKB, Bromma, Schweden

2.3 Antithrombin III - Testkit, Gerinnungsdiagnostika; BOEHRINGER, Mannheim

2.4 Antithrombin III; KABI, Stockholm, Schweden

2.5 Antithrombin III- Konzentrat human; BEHRINGWERKE AG, Marburg

2.6 Äthanol absolut p.A.;MERCK, Darmstadt

2.7 Äthylendiamintetraessigsäure . $Na_2$- Salz; SERVA, Heidelberg

2.8 Beta- Alanin; SERVA, Heidelberg

2.9 Bio Gel P-200; BIO-RAD, Richmond, Kalifornien

2.10 Bio Gel P-300; BIO-RAD, Richmond, Kalifornien

2.11 Borsäure krist. p.A.;MERCK, Darmstadt

2.12 Bromphenol blue tracking dye; HYLAND, Costa Mesa, Kalifornien

2.13 Buffer solution pH 4,01; CORNING MEDICAL, Halstead, England

2.14 Buffer soultion pH 7,02; RADIOMETER, Kopenhagen, Dänemark

2.15 Calibration kit for molecular weight determination using electrophoresis; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.16 Chloride meter standard (100 mmol/l); CORNING MEDICAL, Halstead, England

2.17 Coomassie brilliant blue R 250; BIO-RAD, Richmond, Kalifornien

2.18 Diäthanolamin zur Synthese; MERCK- SCHUCHARDT, Hohenbrunn

2.19 5-5- Diäthylbarbitursäure; MERCK, Darmstadt

2.20 Essigsäure (mind. 96%) p.A.; MERCK, Darmstadt

2.21 Faktor Xa; KABI, Stockholm, Schweden

2.22 Gel filtration calibration kit; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.23 Harnstoff p.A.; MERCK, Darmstadt

2.24 Heparin 5000 I.E./ml; RIKER, Borken

2.25 Heparin- Sepharose CL-6B; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.26 N-2- Hydroxyäthylpiperazin- N'- äthansulfonsäure p.A.; SERVA, Heidelberg

2.27 IMA Säurepuffer; CORNING MEDICAL, Halstead, England

2.28 Imidazol; SERVA, Heidelberg

2.29 Kontrollplasma für Partigen; BEHRINGWERKE AG, Marburg

2.30 Liquemin; HOFFMANN - LA ROCHE, Grenzach

2.31 LN- Antiserum gegen AT III; BEHRINGWERKE AG, Marburg

2.32 L-Lysinmonohydrochorid für biochemische Zwecke; MERCK, Darmstadt

2.33 Methanol, reinst; MERCK, Darmstadt

2.34 Molecular weight protein standards for SDS gel electrophoresis; BIO-RAD, Richmond, Kalifornien

2.35 M- Partigen gegen AT III, Albumin und beta- Lipoprotein BEHRINGWERKE AG, Marburg

2.36 Natriumchlorid krist. p.A.; MERCK, Darmstadt

2.37 Natriumdodecylsufat (SDS); BIO-RAD, Richmond, Kalifornien

2.38 Natronlauge (1 mol/l); MERCK, Darmstadt

2.39 Piperazin wasserfrei zur Synthese; MERCK, Darmstadt

2.40 Polyacrylamide gradient gel PAA 4/30; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.41 Polybuffer exchanger PBE 94; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.42 Polybuffer 74; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.43 Polyäthylenglykol Typ 20000; SERVA, Heidelberg

2.44 Propanol -(2) p.A.; MERCK, Darmstadt

2.45 S-2222; KABI, Stockholm, Schweden

2.46 S-2238 Testkit; KABI, Stockholm, Schweden

2.47 Saccharose, reinst; MERCK, Darmstadt

2.48 Salzsäure (1 mol/l); MERCK, Darmstadt

2.49 Sepharose CL-6B; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Upsala, Schweden

2.50 Sephadex G-100; PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala, Schweden

2.51 Standard- Human- Serum; BEHRINGWERKE AG, Marburg

2.52 5- Sulfosalicylsäure (Dihydrat); MERCK, Darmstadt

2.53 Thrombin (Coatest); KABI, Stockholm, Schweden

2.54 Thrombine 0,1 g; HOFFMANN - LA ROCHE, Grenzach

2.55 Triäthanolaminhydrochlorid p.A.; MERCK, Darmstadt

2.56 Trichloressigsäure p.A.; MERCK, Darmstadt

2.57 Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat p.A.; MERCK, Darmstadt

2.58 Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan p.A.; MERCK, Darmstadt

# 3. Methoden

## 3.1 Affinitätschromatographie

### 3.1.1 Versuchsaufbau:

Für die Affinitätschromatographie wurden Chromatographiesäulen mit einem Volumen zwischen 30 und 500 ml verwendet. Die Anordnung bestand aus einem Gradientenmischer (GM-1, PHARMACIA FINE CHEMICALS AB), einer Schlauchpumpe (Varioperpex II, LKB), einem Dreiwegventil, der Chromatographiesäule, einem UV- Monitor (Uvicord S, LKB) und einem Fraktionssammler (Multirac, LKB). Ein Kompensationsschreiber (Typ 2210, LKB) diente zur Aufzeichnung der Extinktion, welche im UV- Monitor gemessen wurde. Die Versuchsanordnung wurde bei 4° C betrieben.

### 3.1.2 Versuchsablauf:

Zur Adsorption der Proben an die Liganden des Affinitätsgels wurden zwei Methoden angewandt.
Die Proben wurden mit dem Gel eine Stunde lang in Puffer inkubiert. Das Gel mußte dann in der Chromatographiesäule sedimentieren. Bei der anderen Methode wurden die Proben mit der Schlauchpumpe über das fertig geschüttete Gel in der Säule gepumpt.
Für die Desorption wurden verschiedene Puffer verwendet.

## 3.2 Gelchromatographie

Für die Gelfiltration wurden Gelvolumina von 300 bis 450 ml eingesetzt. Die Versuchsanordnung bestand aus Pufferreservoir, Dreiwegventil, Chromatographiesäule, Schlauchpumpe, UV- Monitor und Fraktionssammler mit Auf-

zeichnung der Extinktion auf einen Kompensationsschreiber. Die Versuchsanordnung lief bei Raumtemperatur. Zur Elution wurde jeweils ein Puffer verwendet.
Zur Berechnung der Molekulargewichte mußten die Chromatographiesäulen mit Standardproteinen geeicht werden. Dazu diente der "gel filtration calibration kit" (siehe 2.22).

## 3.3 Chromatofocusing

Die Chromatographiesäule war mit Polybuffer exchanger PBE 94 (siehe 2.41) gefüllt. Vor der Säule waren ein Vorratsbehälter fuer den Puffer, eine Schlauchpumpe (Varioperpex II, LKB) und ein Dreiwegventil angeordnet. Hinter die Säule wurde ein Durchflußphotometer (Uvicord S, LKB) mit Kompensationsschreiber und ein Fraktionssammler (Multirac, LKB) geschaltet. Die Versuche liefen bei Raumtemperatur ab. Zur Elution diente der Polybuffer 74 (siehe 2.42).

## 3.4 High Pressure Liquid Chromatography ( HPLC )

Die Versuchsanordnung setzte sich aus Pufferreservoir, Schlauchpumpe (Micro Perpex, LKB), Septuminjektor zur Probenapplikation, erste Chromatographiesäule (Ultropac Precolumn, LKB), zweiter Chromatographiesäule (Ultropac Column, LKB), UV- Monitor (Uvicord S HPLC, LKB) mit Kompensationsschreiber und Fraktionssammler zusammen. Die Verbindungen zwischen den Komponenten bestanden aus Metall- Kapillarröhrchen, da im System zwischen der Pumpe und den Chromatographiesäulen ein hoher Druck aufgebaut wird. Die Applikationen der Proben erfolgte mit Nadel und Spritze in den Septuminjektor. Der Versuchsaufbau lief bei Raumtemperatur. (17)

## 3.5 Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Verwendet wurden Polyacrylamida gradient gels PAA 4/30 (siehe 2.40). Als Elektrophoresekammer diente der Typ GE- 4 II (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB). Der Elektrophoresepuffer wurde auf 15° C temperiert. Die Probenapplikation erfolgte mit einer Mikropipette (HAMILTON) auf den Probenaufträger. Zur Eichung der Elektrophoresen diente der "Calibration kit for molecular weight determination using electrophoresis" (siehe 2.15).
Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamid- Platten eine Stunde lang in Fixierlösung und darauf zwei Stunden in Färbelösung gelegt. Dann wurden sie in der Klärlösung entfärbt, bis sich die Banden gut darstellten.

Fixierlösung:

| | |
|---|---|
| 57,0 g | Trichloressigsäure |
| 17,0 g | Sulphosalicylsäure |
| 150,0 ml | Methanol |
| 350,0 ml | Aqua bidest. |

Färbelösung:

| | |
|---|---|
| 2,5 g | Coomassie brilliant blue R 250 |
| 454,0 ml | Methanol |
| 92,0 ml | Essigsäure |
| 454,0 ml | Aqua bidest. |
| | filtrieren |

Klärlösung:

| | |
|---|---|
| 500,0 ml | Essigsäure |
| 1500,0 ml | Äthanol |
| 3000,0 ml | Aqua bidest. |

## 3.6 SDS- Gelelektrophorese

Die Methode entspricht der unter 3.5 beschriebenen, es wurde dem Elektrophoresepuffer und den Proben noch Natri-

umdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Zur Eichung dienten die "Molecular weight protein standards for SDS gel electrophoresis" (siehe 2.34).
Die Verarbeitung nach der Elektrophorese erfolgte im Gel-Destainer (PHARMACIA FINE CHEMICALS AB), 30 min lang fixieren, 45 min färben und 45 min entfärben. Die benötigten Lösungen waren folgende:

Fixierlösung:
250,0 ml iso- Propanol
100,0 ml Essigsäure
650,0 ml Aqua bidest.

Färbelösung:
1,0 g Coomassie brilliant blue R 250
250,0 ml Methanol
100,0 ml Essigsäure
650,0 ml Aqua bidest.

Entfärbelösung:
250,0 ml Methanol
100,0 ml Essigsäure
650,0 ml Aqua bidest.

3.7 Konzentrationsbestimmung von AT III, Albumin und beta-Lipoprotein mit radialer Immundiffusion

Es handelt sich um die radiale Immundiffusion. Verwendet wurden die M- Partigen- Agaroseplatten mit den jeweiligen monospezifischen Antiseren (BEHRINWERGE AG). Mit einer Mikropipette wurden die Proben von 5 µl Menge jeweils in ein Probenloch der Agarplatten gegeben. Nach zwei Tagen hatte sich dann ein Präzipitatring bei Anwesenheit von AT III gebildet, dessen Durchmesser der AT III-Konzentration proportional war. (siehe 5.2)

3.8 Bestimmung der AT III- Aktivität

Die AT III- Aktivität wurde mit dem Boehringer Test, Antithrombin III - Gerinnungsdiagnostika (siehe 2.3), bestimmt. Bei diesem photometrischen Bestimmungsverfahren wurde ein Eppendorf- Photometer verwendet. Folgender Reaktionsablauf liegt vor :

$$\text{AT III} + \text{Heparin} \longrightarrow [\text{AT III} \cdot \text{Heparin}]$$

$$[\text{AT III} \cdot \text{Heparin}] + \text{Thrombin (Überschuß)} \longrightarrow [\text{AT III} \cdot \text{Heparin} \cdot \text{Thrombin}] + \text{Thrombin (Rest)}$$

$$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-pNA} + H_2O \xrightarrow{\text{Thrombin}} \text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH} + \text{p-Nitroanilin}$$

3.9 Nachweis von Faktor Xa mit S-2222

Es wurden 300 µl chromogenes Peptid S-2222, sowie 200 µl beta- Alanin- Puffer (0,25 mol/l, pH 8,5) und 100 µl der zu untersuchenden Probe bei Raumtemperatur zusammengegeben. Bei quantitativen Messungen wurde die Extinktion gegen den Leerwert 300 µl S-2222 und 300 µl beta- Alanin- Puffer photometrisch gemessen. (18)

3.10 Nachweis von Thrombin mit S-2238

Dazu wurden 300 µl Probe, 300 µl chromogenes Peptid S-2238 und 900 µl Aqua bidest. zusammengegeben. Die Extinktion bei 405 nm wurde photometrisch gegen einen Leerwert gemessen.

3.11 Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration

Die Eiweißkonzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer UV 5260 von Beckmann bestimmt. Die Extinktion der

Proben wurde zwischen 260 und 320 nm Wellenlänge gegen einen Leerwert gemessen. Mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten und folgender Formel läßt sich die Gesamteiweißkonzentration berechnen:

$$E = 2 \cdot E_{278nm} - ( E_{268nm} + E_{288nm} )$$

Der spezifische Extinktionskoeffizient für Albumin beträgt 0,34 für 1 mg/ml Konzentration. Da der Koeffizient für AT III zunächst nicht bekannt war, wurde der von Albumin angenommen. Dadurch wurden die absoluten Ergebnisse systematisch geringfügig verfälscht. Zur Korrektur der Werte bei Vorliegen von reinem AT III siehe Abschnitt 4.1.2.4 .

3.12 Aminosäurenanalyse von AT III

Eine Probe mit hoch gereinigtem AT III wurde im Verhältnis 1 : 2 mit 6 n Salzsäure versetzt und für 24, 48 und 72 h bei 110° C unter Luftabschluß hydrolysiert. Dann wurde die Salzsäure abgedampft. Zur Trennung der Aminosäuren wurden die drei Hydrolysate mit dem Biotronik- Aminosäureanalysator LC 6000 E flüssigkeitschromatographisch getrennt. Die Aminosäuren wurden mit Ninhydrin angefärbt und deren zeitliches Erscheinen sowie deren Extinktion auf einem Kompensationsschreiber registriert. Aus der Höhe der Extinktionsgipfel läßt sich das Vehältnis der Aminosäuren errechnen.

3.13 Gelscanning von Faktor Xa

Beim Gelscanning wurde eine PAA-Elektrophorese, wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben, hergestellt und gefärbt. Im Beckmann Spektralphotometer UV 5260 wurde ein Licht

spalt von 0,1 mm Breite eingestellt. Die Länge des Spaltes entsprach der Breite der Elektrophorese. Das Gel wurde in seiner gesamten Länge vor dem Spalt vorbeigezogen und die Farbdichte im Gel in Abhängigkeit vom Ort auf dem Kompensationsschreiber aufgezeichnet.

3.14 Differenz- Mikrokalorimetrie

Verwendet wurde ein "Microcalorimetry system 2107" von LKB, zur Registrierung ein Kompensationsschreiber (2210, LKB). In einem Küvettenpaar kamen Substrat und Enzym zur Mischung, im anderen Küvettenpaar Enzym und Lösungsmittel. Die Differenz der Wärmeentwicklung bzw. des Wärmeentzuges wurde unmittelbar nach dem Mischvorgang bis zum Angleichen an die Ausgangstemperatur gemessen. Die Ausgangstemperatur wurde auf 37° C eingestellt.

# 4. Ergebnisse

## 4.1. Isolierung von Antithrombin III mit Heparin- Sepharose

### 4.1.1 Isolierung aus handelsüblichen AT III- Konzentraten

#### 4.1.1.1 Desorption von AT III mit Natriumchlorid

Als Methode wurde die Affinitätschromatographie verwendet, wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben. Folgende Puffer wurden verwendet:

Puffer Nr.1 :
0,05 mol/l Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
0,15 mol/l Natriumchlorid
mit Salzsäure eingestellt auf pH 8,5

Puffer Nr.2 :
0,10 mol/l Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
0,15 mol/l Natriumchlorid
mit Salzsäure eingestellt auf pH 7,4

Puffer Nr.3 :
0,10 mol/l Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
1,50 mol/l Natriumchlorid
mit Salzsäure eingestellt auf pH 7,4

Puffer Nr.4 :
0,10 mol/l Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
0,50 mol/l Natriumchlorid
mit Salzsäure eingestellt auf pH 7,4

Puffer Nr.5 :
0,10 mol/l Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
2,00 mol/l Natriumchlorid
mit Salzsäure eingestellt auf pH 7,4

Fünf Abfüllungen AT III (siehe 2.4) mit insgesamt 50 IU AT III wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst und über Nacht im Dialyseschlauch gegen Puffer Nr.1 dialysiert. In der Probe ergab sich ein pH- Wert von 8,52 und eine Chloridionenkonzentration von 0,152 mol/l. Etwa 40 ml Heparin- Sepharose- Gel wurden in Puffer Nr.1 resuspendiert und mittels Sogfiltration mit diesem Puffer gewaschen, bis kein Schaum und keine "fines" mehr erschienen. Dann folgte Entgasung im Exsikkator.

Zur Bindung des AT III an das Gel wurde das Dialysat mit der Heparin- Sepharose 60 min lang bei 20° C unter leichtem Rühren inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Gel mit dem zehnfachen Volumen von Puffer Nr.2 gewaschen. Dann wurde das Gel in eine Chromatographiesäule gegossen und mußte sich dort unter freiem Durchfluß von Puffer Nr.2 absetzen.

Der Gradientenmischer wurde mit 100 ml Puffer Nr.2 und 125 ml Puffer Nr.3 gefüllt. Bei der Chromatographie ergab sich damit ein Anstieg der Natriumchloridkonzentration im Elutionspuffer von 0,15 bis 1,50 mol/l.

Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit der Schlauchpumpe auf 1,2 ml/min eingestellt. Das Eluat wurde in 6 ml große Proben fraktioniert. Die Proben, bei denen der UV-Monitor einen Anstieg der Extinktion registrierte, wurden mit radialer Immundiffusion (siehe 3.7) auf den Gehalt an AT III untersucht. Das geschah ebenfalls mit der eingesetzten AT III- Probe und dem Puffer, welcher zum Waschen des Gels verwendet wurde.

Im Waschpuffer wurde kein AT III nachgewiesen, es wurde also das gesamte AT III an das Gel gebunden. Der Gipfel der Eiweißelution lag an der gleichen Stelle wie der Gipfel der AT III- Konzentration. Dieser Gipfel erschien bei einer Chloridionenkonzentration von 0,82 mol/l. Der Wert gibt etwa auch die Natriumkonzentration an. Diese liegt jedenfalls aber tiefer als die Chloridionenkonzentration, weil sich die Puffer aus Natriumchlorid und Salzsäure zusammensetzen.

Die Proben, welche AT III enthielten, wurden zusammengegeben und gegen Puffer Nr.1 mit 10 % Polyäthylenglykol dialysiert. Damit wurde eine Aufkonzentrierung und eine Senkung der Natriumchloridionenkonzentration erreicht.

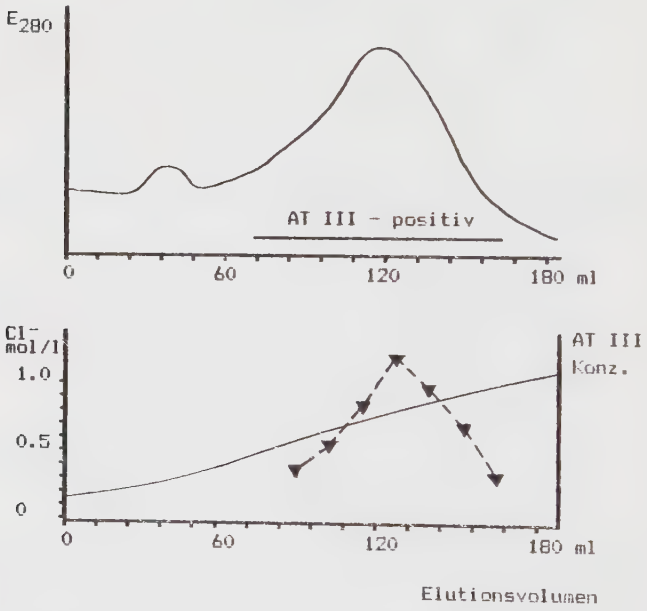


Abbildung Nr.1 :

AT III- Desorption von Heparin- Sepharose mit NaCl- Gradienten. Extinktion des Eluats, Verlauf der Chloridionenkonzentration und der AT III- Konzentration im Eluat (Dreiecke).

Der zuvor beschriebene Versuch wurde wiederholt, wobei die Puffer Nr.2 und Nr.3 gegen die Puffer Nr.4 und Nr.5 ausgetauscht wurden. Nach der Inkubation des Gels mit der Probe erfolgte das Waschen des Gels mit Puffer Nr.4. Die Elution erfolgte dann mit einem Salzgradienten von 0,50 bis 2,00 mol NaCl/l. Hier erschien der Gipfel der AT III- Fraktion bei einer Natriumchloridkonzentration von 0,85 mol/l. Die Dialyse der AT III-haltigen Proben erfolgte gegen Puffer Nr.2 mit 10 %

Polyäthylenglykol. Es wurde eine Chloridionenkonzentration von 0,23 mol/l und ein Eiweißgehalt von 0,76 g/l erreicht. Die AT III- Konzentration lag über 0,50 g/l. Die Probe wurde für spätere Versuche bei -60° C eingefroren.
Von der gewonnen Probe wurde eine PAA- Elektrophorese hergestellt (siehe 3.5). Es zeigte sich eine wesentliche Reinigung im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Die Bande des AT III zeigte etwa im Vergleich zu Standardproteinen (siehe 2.15) ein Molekulargewicht von 72 000. Als Verunreinigung fanden sich noch zwei schwache Banden mit Molekulargewichten von ca. 90 000 und ca. 170 000 .

4.1.1.2 AT III- Desorption mit anderen Puffern

Es sollte das Desorptionsverhalten von AT III an Heparin- Sepharose bei Verwendung unterschiedlicher Puffersubstanzen untersucht werden. Als Methode wurde die Affinitätschromatographie, wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben, verwendet. Folgende Puffer kamen zur Anwendung:

Puffer Nr.1 : siehe 4.1.1.1
Puffer Nr.2 : siehe 4.1.1.1
Puffer Nr.3 : siehe 4.1.1.1
Puffer Nr.6 :
0,05 mol/l L- Lysinmonohydrochlorid
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
mit Natronlauge eingestellt auf pH 7,4
Puffer Nr.7 :
1,50 mol/l L- Lysinmonohydrochlorid
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
mit Natronlauge eingestellt auf pH 7,4
Puffer Nr.8 :
0,10 mol/l beta- Alanin
0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat
ohne Einstellung pH 7,45

Puffer Nr.9 :

1,50 mol/l beta- Alanin

0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat

ohne Einstellung pH 7,45

Puffer Nr.10:

0,10 mol/l Diäthanolamin

0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat

mit Salzsäure eingestellt auf pH 7,4

Puffer Nr.11:

1,50 mol/l Diäthanolamin

0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat

mit Salzsäure eingestellt auf pH 7,4

Puffer Nr.12:

0,10 mol/l Triäthanolaminhydrochlorid

0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat

mit Natronlauge eingestellt auf pH 7,4

Puffer Nr.13:

1,50 mol/l Triäthanolaminhydrochlorid

0,01 mol/l Tri- Natriumcitrat- 2- hydrat

mit Natronlauge eingestellt auf pH 7,4

In einer Chromatographiesäule von 40 cm Länge und 10 mm Durchmesser wurde Heparin- Sepharose in Puffer Nr.1 äquilibriert. 250 U Antithrombin III der Firma Behring (siehe 2.5) wurden in 5 ml Aqua bidest. gelöst, mit 45 ml Puffer Nr.1 verdünnt und mit einer Durchfluß-geschwindigkeit von 1 ml/min durch die Chromatographie-säule gepumpt. Dabei erfolgte die Adsorption an die Heparin- Sepharose. Danach wurde die Säule noch solange mit Puffer Nr.1 durchflossen, bis im Eluat kein Eiweiß mehr nachweisbar war.

Für die Desorption wurden verschiedene Gradientenpuffer verwendet. Die Elution erfolgte mit je zwei Puffern mit jeweils 100 ml Volumen. Das Eluat wurde in Proben von 1 ml fraktioniert. Zwischen den Versuchen wurde das Gel mit 6 mol/l Harnstoff in Puffer Nr.1 regeneriert.

4.1.1.2.1 Desorption mit Natriumchlorid

Dieser Versuch entspricht qualitativ dem Versuch im Abschnitt 4.1.1.1 und sollte zum Vergleich dienen. Der Salzgradient verlief von 0,15 bis 1,50 mol/l. Der Verlauf wurde anhand der Chloridionenkonzentration verfolgt. Die AT III- Konzentration in den Proben des Eluats wurde mit radialer Immundiffusion gemessen.

4.1.1.2.2 Desorption mit Lysin

Der Aminosäuregradient wurde von 0,05 bis 1,50 mol/l mit den Puffern Nr.6 und Nr.7 eingestellt. Der Verlauf der Lysinkonzentration wurde indirekt über die Osmolarität mit dem Osmometer der Firma Vogel bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit den Elutionspuffern erstellt. Der Gipfel der Eiweißdesorption wurde bei einer Lysinkonzentration von 0,3 mol/l erreicht. Die höchsten AT III- Konzentrationen der Elutionsproben lagen in dem Bereich zwischen 0,3 und 0,45 mol/l Lysin.
Bei der Regeneration des Gels mit 6 mol/l Harnstoff in Puffer Nr.1 fand sich kein AT III mehr.

4.1.1.2.3 Desorption mit beta- Alanin

Es wurde ein beta- Alaningradient von 0,10 mol/l bis 1,50 mol/l eingestellt. Es erfolgte während der Elution keine Desorption von AT III oder anderen Proteinen. Bei der Regeneration der Heparin- Sepharose mit 6 molarer Harnstofflösung in Puffer Nr.1 erschien erst das AT III im Eluat.

4.1.1.2.4 Desorption mit Diäthanolamin

Da Diäthanolamin selbst eine hohe Extinktion bei 280 nm aufweist und diese mit Konzentrationssteigerung zunimmt, wurde zunächst eine Chromatographie ohne Probenauftrag

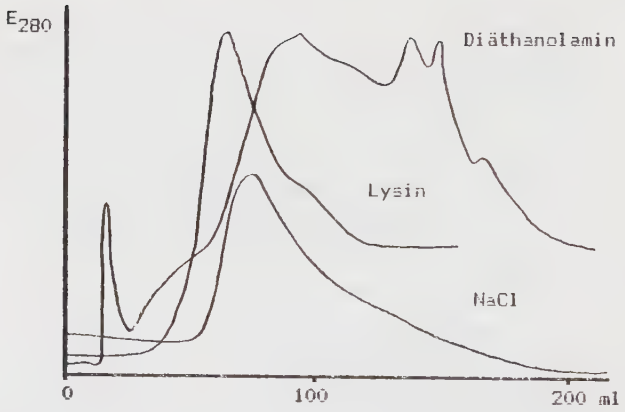


Abbildung Nr.2 :

AT III- Desorption von Heparin- Sepharose. Extinktion (gemessen bei 280 nm) des Eluats bei Verwendung von NaCl, Lysin oder Diäthanolamin als Desorptionspuffer

und dann ein normaler Lauf durchgeführt. Die Differenz zwischen beiden Extinktionskurven ergab dann die Extinktion durch die desorbierten Proteine. Der Diäthanolamingradient verlief von 0,10 bis 1,50 mol/l.
Es erfolgte eine weitgezogene Desorption mit meheren Gipfeln über den gesamten Konzentrationsbereich des Diäthanolamin. AT III war in allen Proben nachweisbar. Der Verlauf der Extinktionskurve spricht dafür, daß das AT III in meheren Fraktionen desorbiert wurde. Bei der Regeneration des Gels mit 6 mol/l Harnstoff in Puffer Nr.1 fand sich nach dieser Chromatographie kein AT III mehr.

4.1.1.2.5 Desorption mit Triäthanolamin

Die Desorption erfolgte mit einer Triäthanolaminkonzentration von 0,10 bis 1,50 mol/l.

Es ergab sich ein flacher, weit gezogener Gipfel, welcher an der gleichen Stelle wie das Maximum der AT III-Konzentration im Eluat lag. Die Veteilung des AT III war zweigipflig.
Bei der Regeneration des Gels mit 6 molarer Harnstofflösung in Puffer Nr.1 war kein Eiweiß nachweisbar.

4.1.1.3 Molekulargewichtbestimmung mit Gelchromatographie

Zur Molekulargewichtbestimmung von AT III wurde die Gelfiltration (Methode siehe 3.2) angewandt. Bio-Gel P-200 (siehe 2.9) wurde in Methanol suspendiert und über Nacht in physiologischer Kochsalzlösung stehengelassen. Nach Absaugen grober Teilchen wurde das Gel in den Elutionspuffer überführt:

Elutionspuffer: 0,025 mol/l HEPES (siehe 2.26)
0,125 mol/l Natriumchlorid
eingestellt mit Salzsäure auf pH 7,5

Nach Entgasung des Gels im Exsikkator erfolgte das Gießen des Gels in eine Chromatographiesäule von 82,5 cm Länge und 2,6 cm Durchmesser. Das Volumen der Säule betrug also $V_t$ = 438 ml.
Zur Eichung der Säule unter Verwendung des "Gel filtration calibration kit" (siehe 2.22) wurde eine Chromatographie mit Blue Dextran 2000 als Probe durchgeführt, um das Ausschlußvolumen $V_o$ zu ermitteln. Außerdem wurden von den Eichproteinen Albumin, Chymotrypsin, Ovalbumin und Ribonuklease die Elutionsvolumina $V_e$ bestimmt.
Mit der Formel

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

wurden die Verteilungskoeffizienten der Proteine errechnet. In der Eichkurve trägt man die Verteilungs-

koeffizienten zu dem Logarithmus der Molekulargewichte auf.
In einer weiteren Chromatographie wurden 3 IU AT III der Firma Kabi in Elutionspuffer aufgetragen und das Elutionsvolumen gemessen.

| | Mol.-Gewicht | $V_e$ | $k_{av}$ |
|---|---|---|---|
| Blue Dextran | - | 130 ml = $V_0$ | - |
| Albumin | 67 000 | 153 ml | 0,075 |
| Ovalbumin | 43 000 | 178 ml | 0,156 |
| Chymotrypsin | 25 000 | 251 ml | 0,393 |
| Ribonuklease | 13 700 | 295 ml | 0,536 |
| AT III | ? | 152 ml | 0,072 |

Aus der Eichkurve ergab sich für das AT III ein Molekulargewicht von 67 000 Daltons.

4.1.2 Isolierung von AT III aus Plasma

Zur Isolierung und Reinigung des AT III aus humanem Zitratplasma werden zwei aufeinanderfolgende Chromatographiedurchläufe benötigt. Methode siehe 3.1 und verwendete Puffer Nr.1 bis Nr.4 siehe 4.1.1.1.
2600 ml Plasma und 2600 ml Puffer Nr.1 wurden mit 340 ml Heparin- Sepharose unter leichtem Rühren 30 min. lang zur Adsorption stehengelassen. Die Heparin- Sepharose wurde in eine Chromatographiesäule von 5 cm Durchmesser gegeben und mit 2,5 l Puffer Nr.1 gereinigt. Das Gel wurde im Puffer Nr.2 nachgewaschen, bis kein Eiweiß mehr nachweisbar war. Die Desorption erfolgte dann mit einem Salzgradienten von 0,15 bis 1,50 mol/l Natriumchlorid (Puffer Nr.2 und Nr.3). Dazu wurden jeweils 400 ml des niedermolaren und höhermolaren Puffers in einen Gradientenmischer gegeben. Die Durchflußgeschwindigkeit der Chromatographiesäule wurde mit der Pumpe auf 2 ml/min. begrenzt.

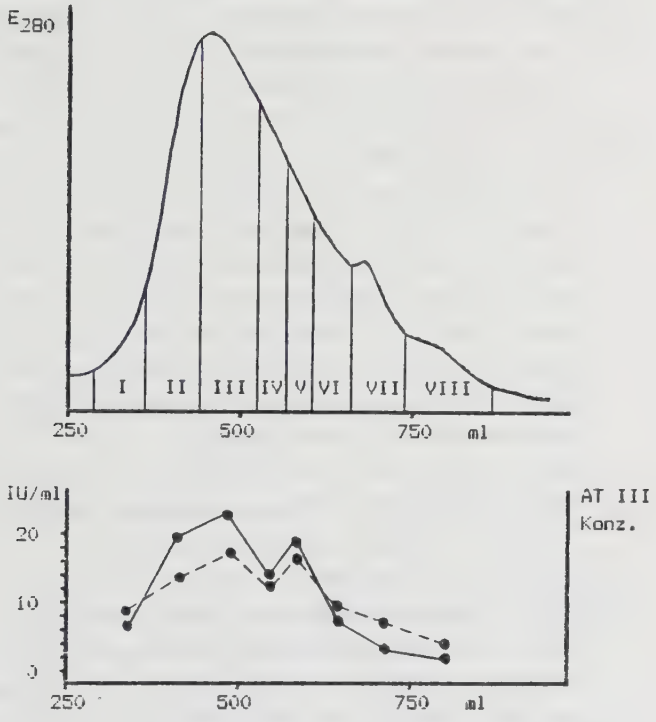


Abbildung Nr.3 :

Isolierung von AT III aus Plasma
Desorption des AT III von Heparin- Sepharose mit NaCl
oben: Extinktionsverlauf der Elution
unten: AT III- Gehalt im Eluat
Aktivität (IU/ml) durchgezogene Linie
Konzentration durchbrochene Linie

In den Fraktionen wurde mit der Methode nach 3.8 die AT III- Aktivität bestimmt. Die Proben, in denen das AT III nachweisbar war, wurden zusammengegeben und im Dialyseschlauch zunächst gegen Aqua bidest. und dann gegen Puffer Nr.1 dialysiert. Damit sollte möglichst

schnell eine Senkung der Salzkonzentration erreicht werden, da die Aktivität des AT III bei hohen Salzkonzentrationen schnell abnimmt. Es wurde so lange dialysiert, bis eine Salzkonzentration von ca. 0,15 mol/l und ein pH- Wert von 8,5 erreicht wurde. Die Probe wurde dann über Nacht bei -40° C eingefroren.

Die Heparin- Sepharose wurde für die zweite Chromatographie mit 1,5 l 6 molarer Harnstofflösung in Puffer Nr.1 von noch gebundenen Proteinen befreit und wieder mit Puffer Nr.1 äquilibriert, bis kein Harnstoff mehr eluiert wurde. Es folgte die Adsorption der Probe aus dem ersten Chromatographielauf. Alle ungebundenen Proteine wurden dann mit dem Puffer Nr.4 (0,50 mol/l NaCl) ausgewaschen. Es erschien hier kein AT III.

Dann erfolgte die Desorption mit einem Salzgradienten von 0,50 bis 1,50 mol/l Natriumchlorid. Die beiden Puffer Nr.4 und Nr.3 hatten ein Volumen von je 270 ml. Die fraktionierten Proben des Eluats, welche AT III enthielten, wurden zunächst gegen Aqua bidest. und dann gegen Puffer Nr.1 dialysiert, bis ein pH- Wert von 8,5 und eine Salzkonzentration von 0,15 mol/l erreicht wurde. Die Proben wurden für weitere Untersuchungen bei -40° C eingefroren.

In den 2600 ml Plasma als Ausgangsmaterial befanden sich insgesamt 19 500 IU AT III. Die Proben nach dem zweiten Durchlauf enthielten insgesamt 5450 IU AT III. Das entspricht etwa 28 % der Ausgangsaktivität.

Abbildung Nr.3 zeigt den Extinktionsverlauf des Eluats im zweiten Duchlauf mit der Fraktionierung der Proben, den Verlauf der AT III- Konzentration und der AT III-Aktivität. Es zeigten sich zwei Gipfel in der AT III-Elution.

Die Fraktionen wurden außerdem auf Albumin und beta-Lipoprotein untersucht. Diese Untersuchungen ergaben negative Resultate.

Die folgende Tabelle zeigt die Meßwerte der Proben :

| Fraktion siehe Abbild. Nr.3 | Menge ml | AT III-Konzentration mm Durchmesser Präzipitate | AT III-Aktivität IU/ml | Gesamteiweiß g/l |
|---|---|---|---|---|
| I | 70 | 8,1 | 5,4 | 0,14 |
| II | 80 | 10,7 | 17,2 | 0,29 |
| III | 70 | 12,7 | 21,2 | 0,42 |
| IV | 50 | 10,4 | 12,1 | 0,26 |
| V | 70 | 11,7 | 16,8 | 0,33 |
| VI | 60 | 9,6 | 6,0 | 0,18 |
| VII | 70 | 8,1 | 1,2 | 0,11 |
| VIII | 130 | 5,7 | 0 | 0,06 |

4.1.2.1 Charakterisierung des AT III mit PAA- Elektrophorese

Die acht Fraktionen aus dem Versuch 4.1.2 wurden elektrophoretisch untersucht (Methode siehe 3.5). Als Puffer für die Elektrophorese diente:

0,09 mol/l Tris- hydroxymethyl- aminomethan
0,08 mol/l Borsäure
0,003 mol/l $Na_2$- EDTA
pH- Wert 8,35

Zunächst erfolgte eine Vorelektrophorese ohne Probenauftrag für 20 Minuten bei 70 V Spannung.
Da die Proben relativ wenig Eiweiß enthielten, wurden 20 µl je Probe auf das PAA- Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief dann bei 15° C mit 80 V Spannung über 18 Stunden.
Zur Eichung wurde gleichzeitig eine Elektrophorese mit Proteinen des "Calibration kit for molecular weight determination" (siehe 2.15) durchgeführt. Die Laufstrecken der Eichproteine vom Auftragspunkt wurden in einem Diagramm gegen den Logarithmus deren Molekular-

gewichte aufgezeichnet. Aus der Laufstrecke der Proben ließen sich dann deren Molekulargewichte bestimmen. Es zeigte sich, daß die Fraktionen Nr.I bis VI jeweils nur eine Bande aufwiesen. Mit dieser Methode waren keine Verunreinigungen des AT III nachweisbar. Es ergab sich für das AT III ein Molekulargewicht von 80 000. Die Fraktionen Nr.VII und VIII wiesen jeweils noch eine zweite Bande mit einem Molekulargewicht von 75 000 auf.

4.1.2.2 Charakterisierung des AT III mit Chromatofocusing

Zur Methode siehe 3.3. Eine Chromatographiesäule mit 120 ml Polybuffer exchanger PBE 94 wurde verwendet.

Startpuffer:
0,025 mol/l Piperazin
eingestellt mit Salzsäure auf pH 5,5
Elutionspuffer:
Polybuffer 74, 1 : 10 verdünnt mit Aqua bidest.
eingestellt mit Salzsäure auf pH 4,0

Als Probe wurden 10 ml der Fraktion Nr.II aus Versuch 4.1.2 fünf Stunden lang gegen Startpuffer im Dialyseschlauch dialysiert.
Die Durchflußgeschwindigkeit der Säule wurde auf ca. 1 ml/min eingestellt. Das ergab eine Flußgeschwindigkeit von 60 ml/h oder 30 cm/h bei einer Säulenlänge von 60 cm und einem Säulenvolumen von 120 ml.
Zunächst befand sich in der Säule Startpuffer. Die Chromatographie begann mit 5 ml Elutionspuffer, dann folgte die Probe und dann die Elution mit Elutionspuffer. Bei den hier gewählten Puffern wurden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 4,0 bis pH 5,5 getrennt.
Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und der Verlauf der pH- Werte gemessen. Bei der Elution erschien ein einziger, symmetrischer Peak bei einem pH von 4,5. Ein

Nachweis des AT III im Eluat mit radialer Immundiffusion war erfolglos. Die Ursache kann darin begründet sein, daß der Elutionspuffer die Präzipitatbildung stört.

4.1.2.3 Charakterisierung des AT III mit HPLC

10 ml der AT III- Fraktion Nr.II aus Versuch 4.1.2 wurden in einem Konzentrierer der Firma Millipore auf 2 ml eingeengt. Es ergab sich danach eine AT III- Konzentration von 78 IU/ml und ein Eiweißgehalt von 1,31 g/l.
Zur Methode siehe 3.4 . Es wurde eine Chromatographiesäule vom Typ G 3000 SW (Firma LKB, Schweden) mit einem Trennungsvermögen für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 300 000 Daltons eingesetzt.
Als Elutionspuffer diente:

0,025 mol/l HEPES
0,125 mol/l Natriumchlorid
eingestellt mit Salzsäure auf pH 7,4

Puffer und Probe mußten vor der Verwendung entgast und filtriert (Membranfilter mit 1 um Porenweite) werden.
Es wurden 0,2 ml der Probe, entsprechend 0,26 mg Eiweiß, in den Septuminjektor gegeben. Die Elution erfolgte mit dem HEPES- Puffer.
Im Eluat erschienen zwei scharf getrennte, symmetrische Peaks. Eine AT III- Aktivität und -Konzentration waren eng begrenzt nur im Bereich des ersten Peaks zu finden. Der zweite Peak ist durch die Extinktion von Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan zu erklären, in dem die Probe gelöst war. Da dieser Peak weit hinter dem AT III eluiert wurde, muß es sich um eine Substanz mit niedrigem Molekulargewicht handeln.
Diese Chromatographie zeigte, daß in der Probe nur eine homogene Eiweißfraktion des AT III enthalten war.

4.1.2.4 Aminosäurentotalanalyse des AT III

Eine Probe der Fraktion Nr.II aus Versuch 4.1.2 wurde nach der Methode, wie unter 3.12 beschrieben, analysiert. Die Probe enthielt nach Ankonzentrierung mit einem Konzentrierer (Millipore) eine Gesamteiweißkonzentration von 1,46 g/l. Nach der Analyse ergab sich folgende Verteilung der Aminosäuren:

| Aminosäure | µmol/g Gesamteiweiß | Anzahl im Protein | Anzahl mal Molgewicht |
|---|---|---|---|
| ALA | 557 | 42 | 3742 |
| ARG | 466 | 35 | 6097 |
| ASP | 782 | 59 | 7853 |
| CYS | 66 | 5 | 606 |
| GLU | 904 | 68 | 10004 |
| GLY | 298 | 22 | 1652 |
| HIS | 89 | 7 | 1086 |
| ILE | 339 | 25 | 3280 |
| LEU | 716 | 54 | 7084 |
| LYS | 724 | 54 | 7894 |
| MET | 56 | 4 | 597 |
| PHE | 430 | 32 | 5286 |
| PRO | 156 | 12 | 1382 |
| SER | 423 | 32 | 3363 |
| THR | 474 | 36 | 4288 |
| TRP | 197 | 15 | 3063 |
| TYR | 137 | 10 | 1812 |
| VAL | 329 | 25 | 2929 |

In der Summe ergeben sich 7,1 mmol Aminosäuren pro Gramm Gesamteiweiß. Für die weitere Berechnung benötigt man das Molekulargewicht des AT III. Nach dem Ergebnis des Versuches 4.1.2.1 wurde ein Wert von 75 000 Daltons eingesetzt.

Aus der Anzahl der Mole Aminosäure pro Gramm Gesamtei-

weiß dividiert durch Mol AT III pro Gramm Eiweiß ergibt sich die Anzahl dieser Aminosäure im AT III- Molekül. (siehe Tabelle). Diese Berechnung wird für jede Aminosäure durchgeführt.

Nach dem Ergebnis dieser Analyse konnte ermittelt werden, wie genau die spektrophotometrischen Eiweißbestimmungen (siehe Methode unter 3.11) berechnet waren. Es kommt dabei auf den Gehalt des Proteins an Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin an, da diese die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge bestimmen. Aus der Tabelle kann man entnehmen, daß diese drei Aminosäuren zusammen im AT III ein Molekulargewicht von 10 161 Dalton ausmachen. Das sind bei einem Molekulargewicht des AT III von 75 000 Dalton 13,5 % .

Im Albumin beträgt dieser Anteil für Phenylalanin 7,8 % , für Tryptophan 0,19 % und für Tyrosin 4,66 %, insgesamt also 12,65 % (siehe Wiss. Tabellen, Ciba- Geigy). Es errechnet sich zwischen den beiden Anteilen ein Faktor von 1,07. Die Eiweißbestimmungen, welche mit dem molaren Extinktionskoeffizienten für Albumin berechnet wurden, müssen mit diesem Faktor korrigiert werden.

4.1.2.5 Spezifische Extinktion des AT III

Eine AT III Probe von Fraktion II aus Versuch 4.1.2 hatte einen Eiweißgehalt von 0,29 g/l (bestimmt mit Methode 3.11). Die Extinktion dieser Probe betrug bei 280 nm Wellenlänge und einer Temperatur von 20° C gegen den Leerwert 0,382 . Daraus konnte man dann berechnen, daß eine 1 % ige AT III- Lösung (entsprechend 10 g/l AT III) eine Extinktion von 13,2 hat.

## 4.2 Isolierungsversuch von Faktor Xa und Thrombin

### 4.2.1 Gelchromatographie des Faktor Xa

#### 4.2.1.1 Faktor Xa auf Sepharose CL-6B

350 nkat Faktor Xa (Kabi) wurden in 5 ml Aqua bidest. gelöst. Zur Gelchromatographie (zur Methode siehe 3.2) wurde Sepharose Cl-6B verwendet. Die Chromatographiesäule hatte ein Volumen von ca. 100 ml. Als Elutionspuffer diente:

0,025 mol/l HEPES
0,125 mol/l Natriumchlorid
eingestellt auf pH 7,5

Bei der Elution mit 1 ml/min erschienen zwei Gipfel. Die fraktionierten Proben wurden mit dem chromogenen Peptid S- 2222 (Methode siehe 3.9) auf Faktor Xa untersucht. Es lies sich ein Maximum des Faktor Xa im Bereich des zweiten Gipfels nachweisen. Dieses Maximum war um etwa 10 ml Elutionsvolumen vom Extinktionsmaximum verschoben. Es waren also noch weitere Proteine überlagert.
Die Proben, welche Faktor Xa enthielten, wurden zusammengegeben und zur Ankonzentrierung gegen Elutionspuffer mit 10 % Polyäthylenglykol Typ 20000 dialysiert. Nach der Dialyse ergab sich ein Gesamteiweißgehalt von 2,36 g/l.
Die PAA- Elektrophorese (Methode siehe 3.5) des gereinigten Faktor Xa ergab im Vergleich zum Ausgangsmaterial, daß zwei Banden mit einem Molekulargewicht im Bereich von 100 000 und 230 000 Daltons fehlten. Eine Doppelbande bei 140 000 bis 150 000 Daltons wurde hingegen nur abgeschwächt. Die stärkste Bande lag bei einem Molekulargewicht von 65 000 Daltons und war unverändert. Hierbei muß es sich um den Faktor Xa handeln.

4.2.1.2 Faktor Xa auf Bio- Gel P-200

Der Versuchsablauf war identisch mit dem unter Abschnitt 4.1.1.3 beschriebenen. Als Probe wurden 30 nkat Faktor Xa der Firma Kabi in 2 ml Elutionspuffer aufgetragen. Der Gipfel der Elution von Faktor Xa lag bei einem Elutionsvolumen $V_e$ = 152 ml, entsprechend einem Verteilungskoeffizienten $K_{av}$= 0,065. Daraus errechnete sich ein Molekulargewicht für Faktor Xa von 61 000 Daltons.

4.2.2 Gelscanning des Faktor Xa

Zur Methode siehe 3.13 . Untersucht wurde eine PAA-Elektrophorese (Methode siehe 3.5) mit 71 nkat Faktor Xa (Kabi) in 5 ml Aqua bidest., wie in Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben. Die Fläche unter den Extinktionsgipfeln, hervorgerufen durch die Anfärbung der Eiweißbanden, gilt als Maß für den Anteil am Gesamtprotein.
Für die Bande des Faktor Xa bei einem Molekulargewicht von 65 000 Daltons ergab sich eine Fläche von 8,74 $cm^2$ , für die Doppelbande bei einem Molekulargewicht von 140 000 bis 150 000 Daltons eine Fläche von 0,76 $cm^2$. Daraus errechnet sich ein Anteil fremder Proteine von insgesamt 8 % .

4.2.3 Reinigung von Thrombin auf Sephadex G-100

Es handelt sich um eine Gelfiltration (Methode siehe 3.2). Sephadex G-100- Gel wurde in folgendem Puffer gereinigt:

1,50 mol/l Natriumchlorid
0,05 mol/l Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan
eingestellt mit Salzsäure auf pH 8,5

Zur Elution diente Puffer Nr.1 (siehe 4.1.1.1). Die Chromatographiesäule hatte ein Gelvolumen von 370 ml

(70 cm Länge, 2,6 cm Durchmesser).
Der maximale Durchfluß betrug 1,2 ml/min. Die Elution wurde mit halbmaximaler Geschwindigkeit durchgeführt. Als Probe wurde Thrombin (La Roche, siehe 2.54) in 30 ml Elutionspuffer gelöst. Es wurde in der Probe eine Gesamteiweißkonzentration von 0,66 g/l erreicht. Dann erfolgte die Elution. Die fraktionierten Proben des Eluats wurden auf ihren Gehalt an Thrombin untersucht (Methode siehe 3.10). Die thrombinhaltigen Proben wurden vereinigt und mit einem Konzentrierer (Firma Millipore, USA) von 120 ml auf 42 ml ankonzentriert.
Danach ergab sich ein Gesamteiweißgehalt von 1,85 g/l. Das gereinigte Thrombin wurde für weitere Versuche bei -40° C eingefroren.
Die Probe wurde mit PAA- Elektrophorese (Methode siehe 3.5) im Vergleich zum Ausgangsmaterial untersucht. Im Thrombin von La Roche fand sich neben der Bande des Thrombin eine weitere Bande bei einem Molekulargewicht von 67 000. Diese war nach der Chromatographie nicht mehr nachweisbar.

## 4.3 Interaktion zwischen AT III und Faktor Xa sowie Thrombin

### 4.3.1 Gelchromatographie mit in vitro Kombination von AT III und Faktor Xa

Zur Methode siehe 3.2 . Als Elutionspuffer diente:

0,025 mol/l HEPES
0,125 mol/l Natriumchlorid
eingestellt auf pH 7,5

Zur Eichung der Chromatographiesäule siehe Abschnitt 4.1.1.3 . Es erfolgte eine Chromatographie mit einer Probe aus AT III und Faktor Xa, welche in gereinigter Form vorlagen (siehe dazu Versuche 4.1.1.1 und 4.2.1.1)

Beide Proteine wurden in einem etwa äquimolaren Verhältnis für 24 Stunden bei 37° C inkubiert.
Bei der Chromatographie erschien ein symmetrischer Gipfel bei einem Elutionsvolumen von 171 ml. Aus dem Wert errechnete sich ein Verteilungskoeffizient $K_{av}$ = 0,133.
Aus der Eichkurve zu dieser Chromatographiesäule ergab sich daraus ein Molekulargewicht von 46 000 Daltons.
Innerhalb dieses Gipfels ließ sich mit radialer Immundiffusion (Methode siehe 3.7) AT III nachweisen. Faktor Xa konnte im gesamten Verlauf der Chromatographie nicht mehr nachgewiesen werden (Methode siehe 3.9).
Der gleiche Versuch wurde mit den handelsüblichen Präparaten AT III und Faktor Xa (Kabi) durchgeführt. Hierbei erschienen zwei überlagerte Gipfel mit Elutionsvolumina von $V_e$ = 150 ml und $V_e$ = 178 ml . Das entspricht Verteilungskoeffizienten von $K_{av}$ = 0,156 und $K_{av}$ = 0,065, bzw. Molekulargewichten von 43 000 und 56 000 Daltons.
AT III war im zweiten Gipfel mit radialer Immundiffusion nachweisbar. Faktor Xa war insgesamt nicht nachweisbar.
Von den AT III- haltigen Proben wurden PAA- Elektrophoresen angefertigt (Methode siehe 3.5). Alle Proben zeigten eine starke Bande bei 67 000 Daltons und eine schwache Doppelbande bei 75 000 bis 80 000 Daltons.

4.3.2 Affinitätschromatographie mit in vitro Kombination von AT III und Faktor Xa

Zur Methode siehe Abschnitt 3.1 und zum Versuchsablauf 4.1.1.1 . Puffer Nr.1 bis Nr.3 wurden verwendet. Es wurden Faktor Xa und veschiedene Mengen AT III (Kabi) in 0,025 mol/l beta- Alanin- Puffer, eingestellt auf pH 8,4 , 24 Stunden bei 37° C inkubiert.
Die Aktivitätshemmung einer vorgegebenen Menge von Faktor Xa durch AT III ist abhängig von der Aktivität des AT III. Aus der Arbeit (19) ergeben sich folgende Werte:

| Hemmung | Faktor Xa nkat | Antithrombin III IU |
|---|---|---|
| 40 % | 100 | 0,175 |
| 77 % | 100 | 0,351 |
| 96 % | 100 | 0,701 |

Dementsprechend wurden folgende Ansätze inkubiert:

| Probe | Hemmung | Faktor Xa nkat | Antithrombin III IU |
|---|---|---|---|
| I | 40 % | 71 | 0,125 |
| II | 96 % | 71 | 0,500 |
| III | >99 % | 71 | 1,000 |

Die Proben wurden zunächst in Puffer Nr.1 an die Heparin- Sepharose adsorbiert. Das Gel wurde erst mit Puffer Nr.1 und dann mit Puffer Nr.2 nachgewaschen. Die bis hier eluierten nicht gebundenen Proteine enthielten weder AT III noch Faktor Xa. Es folgte die Desorption der gebundenen Proteine mit einem steigenden Natriumchloridgradienten von 0,15 bis 1,50 mol/l. Bei allen drei Chromatographien erschien einheitlich eine Eiweißfraktion bei einer Salzkonzentration von 0,25 mol/l. In dieser Fraktion konnte man mit radialer Immundiffusion kein AT III und mit dem chromogenen Peptid S- 2222 keinen Faktor Xa nachweisen. Bei dieser Fraktion kann es sich um einen Komplex aus Faktor Xa und AT III handeln.

In der Chromatographie mit Probe III, in welcher AT III im Überschuß vorhanden war, erschien zusätzlich eine Fraktion bei einer Salzkonzentration von 0,8 mol/l. Darin konnte AT III nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um die Elution von freiem AT III (vergleiche Chromatographie mit AT III, Abschnitt 4.1.1.1).

In der Chromatographie mit Probe I fand sich eine Ei-

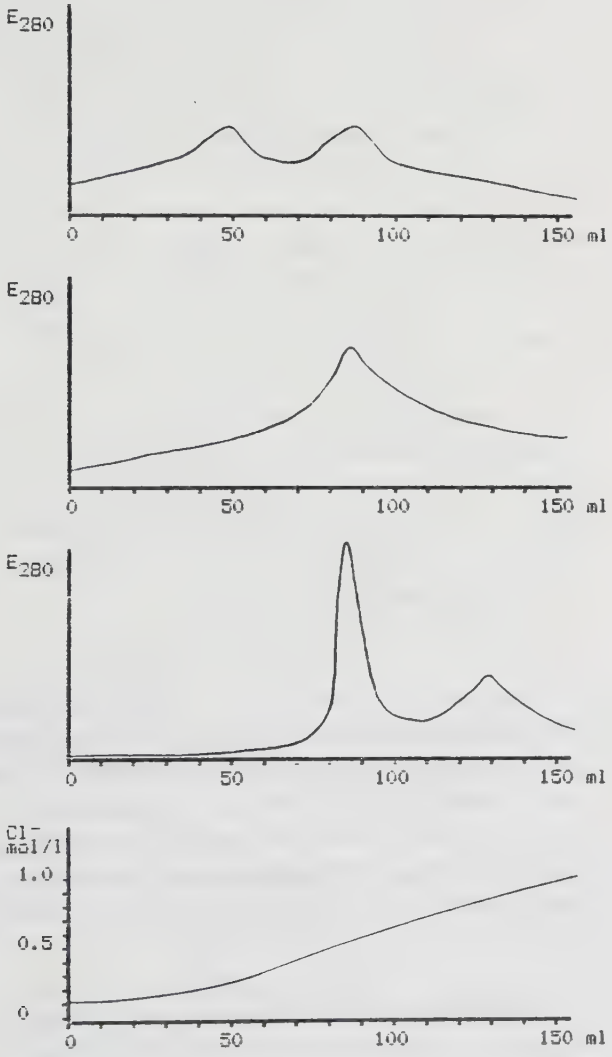


Abbildung Nr.4 :

Affinitätschromatographie mit in vitro Kombinationen von AT III und Faktor Xa

oben: 0,125 IU AT III und 71 nkat Faktor Xa

mitte: 0,5 IU AT III und 71 nkat Faktor Xa

unten: 1,0 IU AT III und 71 nkat Faktor Xa

weißfraktion bei einer Natriumchloridkonzentration von 0,17 mol/l. Faktor Xa und AT III waren nicht nachweisbar. Es kann sich jedoch um inaktivierten Faktor Xa handeln, da Faktor Xa ja nur zu 40 % von AT III gehemmt wurde. Faktor Xa wird von Heparin- Sepharose nicht oder nur schlecht gebunden.

4.3.3 Hemmversuche mit in vitro Kombinationen von AT III mit Faktor Xa sowie Thrombin

4.3.3.1 PAA- Elektrophoresen

Zur Methode siehe 3.5 . Es wurde folgender Elektrophoresepuffer verwendet:

0,09 mol/l Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan
0,08 mol/l Borsäure
0,003 mol/l $Na_2$- EDTA
pH- Wert 8,35

AT III aus dem Versuch 4.1.1.1 lag mit einer Eiweißkonzentration von 0,81 g/l vor. Bei einem Molekulargewicht von 67 000 Daltons sind es 12,1 µmol/l AT III. Faktor Xa aus Versuch 4.2.1.1 hatte eine Eiweißkonzentration von 2,19 g/l. Bei einem Molekulargewicht von 30 000 Daltons sind das 73,0 µmol/l. Daraus wurden Proben in folgenden molaren Mischungsverhältnissen bei 37° C über 12 Stunden inkubiert:

| molares Mischungsverhältnis | AT III | : | Faktor Xa |
|---|---|---|---|
| Probe 1, I | 1 | : | 2 |
| Probe 1, II | 1 | : | 1 |
| Probe 1, III | 2 | : | 1 |

Die Elektrophorese lief 16 Stunden lang mit 100 V Spannung bei einer Temperatur von 16° C .

Nach der Färbung der Elektrophoresen ergab sich bei allen drei Proben das gleiche Bild. Die beiden Banden des AT III und des Faktor Xa waren zu sehen. Zusätzlich ergab sich neben der Bande des AT III zu den höheren Molekulargewichten hin eine schwache Bande, die bei den einzelnen Proteinen AT III und Faktor Xa nicht vorhanden war.

Zum nächsten Versuch wurde hoch gereinigtes AT III aus Versuch 4.1.2 (Fraktion III), Faktor Xa (Kabi) und Heparin (Riker) 20 Minuten lang bei 37° C inkubiert:

| | AT III | Faktor Xa | Heparin |
|---|---|---|---|
| Probe 2, I | 0,125 U | 71 nkat | 0,625 U |
| Probe 2, II | 0,250 U | 71 nkat | 1,250 U |
| Probe 2, III | 0,500 U | 71 nkat | 2,500 U |

Die Elektrophoresebedingungen waren die gleichen wie zuvor beschrieben.
Die Probe 2, I stellte sich wie Faktor Xa dar, die Proben 2, II und 2, III hatten jeweils eine Bande bei einem Molekulargewicht von 56 000 Daltons weniger.

In einem weiteren Ansatz wurden die gleichen Substanzen und Elektrophoresebedingungen eingehalten. In den Ansätzen wurde der AT III- Gehalt konstant gehalten:

| | AT III | Faktor Xa | Heparin |
|---|---|---|---|
| Probe 3, I | 2,0 U | 9 nkat | 10,0 U |
| Probe 3, II | 2,0 U | 18 nkat | 10,0 U |
| Probe 3, III | 2,0 U | 36 nkat | 10,0 U |

Nach der Färbung der Elektrophoresen zeigten sich nur die Banden von AT III und Faktor Xa, es waren durch die Inkubation keine Veränderungen in den Proben nachweisbar.

In den beiden folgenden Versuchen wurde der Faktor Xa durch Thrombin (Kabi) ersetzt. Die Ansätze blieben sonst die gleichen:

| | AT III | Thrombin | Heparin |
|---|---|---|---|
| Probe 4, I | 0,125 U | 67,5 nkat | 0,625 U |
| Probe 4, II | 0,250 U | 67,5 nkat | 1,250 U |
| Probe 4, III | 0,500 U | 67,5 nkat | 2,500 U |

Die Versuchsbedingungen waren unverändert.
Die Elektrophorese von Thrombin allein zeigte zwei Banden bei 140 000 und 430 000 Daltons. Bei den inkubierten Proben erschien bei allen die Bande des AT III bei 72 000 Daltons und eine zweite Bande bei einem Molekulargewicht von 75 000 Daltons. Die Banden des Thrombin waren nicht mehr nachweisbar.

Im nächsten Versuch wurde die Menge des AT III konstant gehalten und die Thrombinkonzentration variiert:

| | AT III | Thrombin | Heparin |
|---|---|---|---|
| Probe 5, I | 2,0 U | 11,2 nkat | 10,0 U |
| Probe 5, II | 2,0 U | 22,5 nkat | 10,0 U |
| Probe 5, III | 2,0 U | 45,0 nkat | 10,0 U |

Thrombin allein zeigte bei diesem Versuch drei Banden bei Molekulargewichten von 400 000, 220 000 und 64 000 Daltons. Die drei Proben wiesen alle Banden bei 72 000 Daltons (entsprechend AT III) und bei 160 000 Daltons auf. Bei Probe 5, I erschien zusätzlich noch eine Bande bei 62 000 Daltons.

In keinem der Versuche konnte ein Komplex von AT III und Faktor Xa bzw. Thrombin positiv nachgewiesen werden.

4.3.3.2 SDS- Elektrophoresen

Zur Methode siehe 3.6 . Als Puffer für die Probenansätze diente:

0,25 mol/l beta- Alanin
eingestellt mit Natronlauge auf pH 8,4

Für die Elektrophorese wurde dann diesem Puffer noch Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt.

2,4 U AT III (Kabi) und 210 nkat Faktor Xa (Kabi) wurden in je 3 ml Aqua bidest. gelöst und getrennt 24 Stunden lang gegen den beta-Alanin- Puffer bei 20° C dialysiert. Danach erfolgte eine Inkubation beider Proben bei 37° C über 7 Stunden. Nach der Inkubation konnte mit dem chromogenen Peptid S- 2222 (Methode siehe 3.9) kein Faktor Xa mehr nachgewiesen werden.
Zur SDS- Elektrophorese wurden die inkubierte Probe und der Elektrophoresepuffer mit 0,2 % Natriumdodecylsulfat versetzt. Untersucht wurden neben den inkubierten Proben auch Faktor Xa und AT III. Die Elektrophorese dauerte 23 Stunden bei 80 V Spannung und einer Temperatur von 16° C.
Es konnte gezeigt werden, daß eine schwache Bande bei einem Molekulargewicht von 80 000 Daltons auftrat, die in den beiden Ausgangsproteinen Faktor Xa und AT III nicht vorhanden war. Als Komplex aus Faktor Xa und AT III konnte diese jedoch nicht sicher nachgewiesen werden. Da die Ausgangsproben nicht rein waren, stellten sich noch fremde Proteine dar, so daß eine weitere Identifizierung nicht sicher war.

Für einen weiteren Versuch wurde AT III aus Fraktion II des Vesuches 4.1.2 mit einem Konzentrierer (Millipore) angereichert. Es ergab sich eine Konzentration von 6 U/ml AT III.

0,6 U AT III und 9 nkat Faktor Xa (Kabi) wurden in beta-Alanin- Puffer bei 37° C inkubiert. Diese Reaktion wurde dann mit Natriumdodecylsulfat nach unterschiedlichen Zeiten gestoppt. Die Menge SDS wurde so gewählt, daß sich eine 0,1 %ige Lösung ergab.

| Probe | Reaktionszeit |
|---|---|
| I | 10 s |
| II | 90 s |
| III | 5 min |
| IV | 10 min |
| V | 20 min |

Nach der Zugabe von SDS wurde zur Denaturierung der Proteine für 60 Sekunden auf 100° C erhitzt.
Die SDS- Elektrophorese lief nach Probenauftrag 10 min lang mit 300 V Spannung und dann eine Stunde bei 150 V. Das elektrophoretische Bild der drei Proben war gleich und zeigte jeweils drei Banden mit einem Molekulargewicht im Bereich von 310 000, 110 000 und 95 000 Daltons. Faktor Xa zeigte ein ähnliches Bild. AT III zeigte eine Bande bei 100 000 Daltons. Ein Komplex konnte also nicht nachgewiesen werden.

### 4.3.4 Mikrokalorimetrische Versuche mit der in vitro Kombination von AT III und Faktor Xa

Die Versuche mit dem Mikrokalorimeter sollten die Reaktionswärme bei der Reaktion von AT III und Faktor Xa sowie Thrombin bestimmen. Das Mikrokalorimeter umfaßte zwei Küvettenpaare, die nebeneinander angeordnet waren. Zur Methode siehe 3.14 . Die beiden Reaktionspartner wurden jeweils in die beiden zusammengehörigen Küvetten gegeben. In das zweite Küvettenpaar kam als Leerwert das Enzym und das Lösungsmittel des Substrats. Die Anordnung wurde dann über 1 bis 2 Stunden in einem Inku-

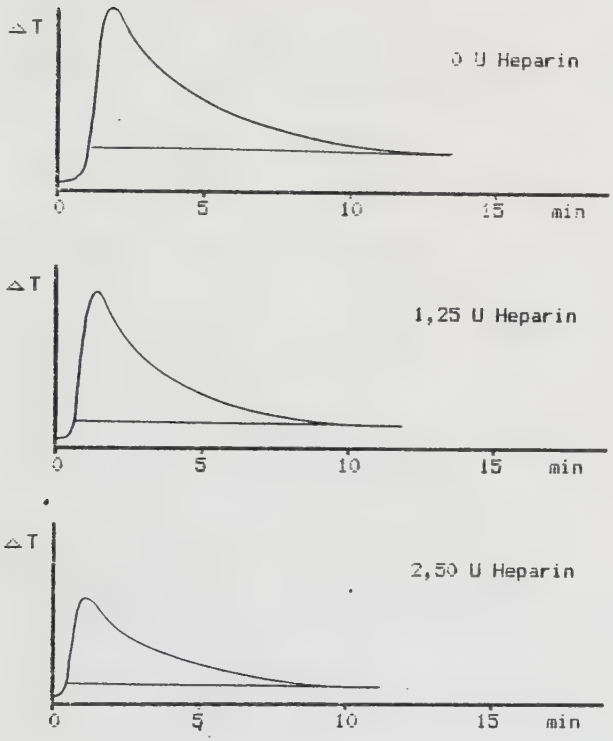


Abbildung Nr.5 :

Differenzmikrokalorimetrische Messung der Reaktion zwischen AT III und Faktor Xa bei verschiedenen Heparinkonzentrationen

bator auf eine Temperatur von 37° C äquilibriert . Nach Temperaturausgleich erfolgte die Mischung der Küvettenpaare. Die Differenz der Wärmeentwicklung in den beiden Küvettenpaaren wurde gemessen und auf einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet. Die bei der Mischung entstehende Lösungswärme stört den Versuch also nicht. In einer Versuchsreihe reagierten 1,25 U AT III aus Versuch 4.1.2 mit 14 nkat Faktor Xa (Kabi). Der Versuch wurde zunächst ohne und dann mit steigender Heparin-

konzentration durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die Ansätze aufgestellt und die Fläche unter der Temperaturkurve (siehe Abbildung Nr.5), welche als Maß für die freigesetzte Wärme gilt.

| AT III U | Faktor Xa nkat | Heparin U | Fläche $^2$ cm |
|---|---|---|---|
| 1,25 | 14 | 0 | 17,5 |
| 1,25 | 14 | 1,25 | 11,8 |
| 1,25 | 14 | 2,50 | 8,5 |
| 1,25 | 14 | 5,00 | <1,0 |

Es stellte sich heraus, daß bei der Anwesenheit von 5 U Heparin keine Reaktionswärme mehr gebildet wurde. Die Bildung der Reaktionswärme war nach maximal 15 Minuten abgeschlossen. 24 Stunden nach der Reaktion wurde das thermokinetische Verhalten überwacht. Es zeigten sich keine Reaktionen mehr. Wie die Abbildung zeigt, bestand zwischen Heparinkonzentration und Wärmebildung ein umgekehrt proportionales Verhältnis.

# 5. Diskussion

## 5.1 Isolierung von AT III mit der Affinitätschromatographie

### 5.1.1 AT III- Chromatographie auf Heparin- Sepharose

Die Affinitätschromatographie selektiert Proteine nach ihrer Biospezifität, d.h. es werden biologische Funktionen von Makromolekülen zur Auftrennung ausgenutzt. Verschiedene Gele aus Sepharose, Polyacrylamid oder Glasperlen kommen zur Anwendung. Auf der Oberfläche dieser porösen Gele sind Liganden unlöslich z.B. über eine Carbamyl- Bindung fixiert. Diese Liganden müssen mit ihrem aktiven Zentrum spezifisch mit dem aufzutrennenden Protein reagieren können.
Bei der in den Versuchen verwendete Heparin- Sepharose Cl-6B dient Heparin als Ligand. Es sind etwa 50 Substanzen mit einer Affinität zur Heparin- Sepharose beschrieben, prädominierend sind aber die Gerinnungsfaktoren. Heparin ist ein stark saures Polysaccharid mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 1 . Es bindet sozusagen alle physiologischen Proteine, da deren isoelektrischen Punkte in höheren pH- Bereichen liegen.
AT III hat die stärkste Affinität zur Heparin- Sepharose von allen Proteinen. Bei der Affinitätschromatographie von Plasma wird also vorwiegend AT III gebunden. Die Adsorption der Probe an die Liganden des Gels muß unter Bedingungen geschehen, bei denen eine Komplexbildung zwischen Probe und Ligand möglich ist. Bei der Elution wird das Milieu des Gels (Puffer) kontinuierlich so verändert, daß sich die Komplexe auflösen. Man kann dazu die Ionenstärke, der pH- Wert oder die Temperatur verändern. Für die Verdrängung des AT III aus der Heparin- Bindung werden mit Erfolg Substanzen verwendet, die basische Eigenschaften haben.

Die Proteine dürfen durch die Behandlung aber nicht irreversibel denaturiert werden, weil das isolierte AT III für weitere Versuche verwendet werden soll, bei denen die biologische Aktivität des Proteins entscheidend ist. Bei der Desorption mit einem Medium steigender Ionenstärke kann es schnell zu einem Aktivitätsverlust der Proteine kommen. Man sollte möglichst bald nach der Elution die Probe in physiologische Bedingungen überführen, z.B. mittels Dialyse.

Zur Elution kann man auch eine Substanz wählen, die eine höhere Affinität zu den Liganden des Gels als die gebundenen Proteine aufweist. Die gebundenen Proteine werden durch diese Substanz verdrängt (20). Da AT III von allen Proteinen an der Heparin- Sepharose am stärksten bunden wird, ist diese Methode in diesem Fall nicht anwendbar.

Bei der Isolierung von AT III (10,11) sind bisher immer Natriumchloridgradienten zur Desorption verwendet worden. AT III wird dabei wegen seiner hohen Affinität zur Heparin- Sepharose als letztes Protein desorbiert. Miller- Andersson (10) beschreibt eine AT III- Desorption bei einer NaCl- Konzentration von etwa 1,0 mol/l, Murano (11) bei 0,6 mol/l für die Isolierung aus Plasma. Bei den eigenen Versuchen fand sich für AT III- Isolierung aus Plasma und aus AT III- Präparaten (KABI) eine Desorption zwischen 0,8 und 0,9 mol/l. AT III (BEHRING) erschien bei einer Natriumchloridkonzentration von 0,65 mol/l.

Bei Salzkonzentrationen in diesem Bereich verliert AT III schnell seine Aktivität. Bei der präparativen Isolierung von AT III wird eine hohe Ausbeute an AT III erwünscht. Es wurden dazu Versuche mit anderen Desorptionsmitteln durchgeführt. Wie unter 4.1.1.2 beschrieben, gelang eine Desorption mit der Aminosäure Lysin und den primären Aminen Diäthanolamin und Triäthanolamin. Damit könnte man erreichen, daß das AT III keinen hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt wird. Die drei Desorp-

tionsmittel sind basisch und reagieren somit leicht mit der Heparin- Sepharose.

5.1.2 Isolierung von AT III aus Plasma

Bei der AT III- Isolierung aus Plasma wurde die Methode nach Murano (11) geringfügig abgeändert.
Es zeigte sich, daß man für die beiden aufeinanderfolgenden Chromatographien nicht unbedingt zwei Säulen mit verschiedenen Gelen verwenden muß, sondern nur eine, wenn man diese Heparin- Sepharose zwischen den Durchläufen mit 6 mol/l Harnstoff in Puffer Nr.1 (siehe Ergebnisse 4.1.1.1) regeneriert. Es wurde beobachtet, daß die Ausbeute an AT III bei schon vorher verwendeter Heparin- Sepharose größer als beim erstmaligen Gebrauch des Gels ist, auch wenn dieses vorschriftsmäßig vorbereitet wurde.
Da das AT III bei Natriumchloridkonzentrationen zwischen 0,8 und 0,9 mol/l eluiert wird, wurde bei der zweiten Chromatographie erst eine Desorption mit 0,5 mol/l NaCl durchgeführt. Damit werden alle ungebunden und leicht gebundenen Proteine desorbiert. AT III bleibt unter diesen Bedingungen vollständig gebunden. Die Desorption des AT III zwischen 0,5 und 1,5 mol/l NaCl konnte dann mit einem schnell ansteigenden Gradienten durchgeführt werden.
Das AT III liegt damit etwa doppelt so hoch konzentriert vor als im Plasma. Es ist allerdings wichtig, das AT III immer wieder schnell in Puffer mit niedriger Ionenstärke zu überführen, da sonst die biologische Aktivität schnell abnimmt. Der pH - Wert des Puffers spielt offensichtlich bei dieser Frage eine nicht so entscheidende Rolle. Für die überführung des AT III in entsprechende Puffer bewährte sich die Dialyse im semipermeablen Dialyseschlauch am besten.
Der Nachweis der Reinheit des gewonnen AT III wurde bis-

her (7.8,7,10) mit Gelelektrophorese, SDS- Elektrophorese und Isoelektrofokussierung durchgeführt.
Hier wurden dazu zwei weitere, neue Methoden verwendet, das Chromatofocusing und die Hochdruckgelfiltration. Mit dem Chromatofocusing kann man Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt auftrennen. Dieser ist für AT III bekannt und wird von Heimburger (21) bei pH 5,11 sowie von Borsodi (22) für zwei AT III- Typen bei pH 4,6 und pH 4,9 angegeben. Beim Chromatofocusing wurde das eigene AT III bei einem pH von ca. 4,5 eluiert. Es erschien ein einziger, scharf begrenzter Elutionsgipfel. Durch die beschriebene AT III- Isolierung wird also ein einheitliches AT III eluiert, obwohl das Elutionsdiagramm bei der Affinitätschromatographie eher dagegen spricht. Dieses ist asymmetrisch und scheint sich aus drei bis vier einzelnen, AT III- haltigen Elutionsfraktionen zusammenzusetzen. Offensichtlich spielt dort das Bindungsverhalten zur Heparin- Sepharose eine Rolle. Mit der Hochdruck- Gelfiltration (HPLC) stand eine Methode zur Verfügung, welche Proteine extrem scharf trennt, auch wenn nur kleine Probenmengen vorliegen. Bei der hochauflösenden Gelfiltration werden Proteine mit sehr ähnlichem Verhalten getrennt. Mit dieser Methode erwies sich die AT III- Präparation als homogen.
Das gesamte AT III- haltige Eluat wurde von uns in verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Es zeigte sich, daß die AT III- Elution bei einer Salzkonzentration von über 1,0 mol/l noch eine zweite Bande in der Elektrophorese aufwies. Es ist daher mit diesem Isolationsverfahren für AT III nicht möglich, das gesamte eluierte AT III als hochgereinigtes Protein zu gewinnen. Das ist quantitativ jedoch nur ein geringer Teil. Diese Beimischung zum AT III erscheint während der Desorption nach der Haupt-AT III- Fraktion. Das bedeutet, daß dieses zweite Protein noch fester an die Heparin- Sepharose angebunden wird als das AT III. Da dieses zweite Protein ein etwas geringeres Molekulargewicht hat als das AT III der

Hauptfraktion, könnte es sich um einen varianten AT III-Typ handeln.

### 5.1.3 Physikochemische Charakterisierung des AT III mittels Aminosäurentotalanalyse

Das AT III, gereinigt nach Abschnitt 4.1.2, lag nach unseren Untersuchungen als reine Substanz vor. Es wurde damit möglich, die Zusammensetzung des Proteins mittels Aminosäurentotalanalyse zu bestimmen. Das AT III wurde hydrolytisch in seine Aminosäuren zerlegt.

Die Versuche sind bereits von Koide (23) mit der gleichen Methode durchgeführt worden. Allerdings war das AT III, welches Koide untersuchte, mit einem anderen Verfahren gereinigt worden. Auch die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte unterschiedlich. Koide untersuchte Hydrolysate nach 22, 44 und 66 Stunden und bildete den Mittelwert seiner Ergebnisse.

Bei der eigenen Methode wurden die Hydrolysate nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen und das Ergebnis auf den Zeitpunkt 0 Stunden extrapoliert.

Zum Vergleich lag eine Aminosäurenanalyse für humanes AT III von Takahara (24) vor.

Die Tabelle vergleicht die Meßergebnisse von Koide und Takahara mit den eigenen Werten für humanes AT III. Insgesamt ist die Anzahl der Aminosäuren in unserer Analyse höher als bei Koide und Takahara. Der Anteil der Aminosäuren Serin und Cystein war bei den drei Analysen nahezu gleich. Die drei Analysen ergeben für das AT III einen hohen Anteil der sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Asparagin und Asparaginsäure sowie Glutamin und Glutaminsäure werden bei den Bestimmungsmethoden gemeinsam erfaßt. Von den basischen Aminosäuren ist Lysin am häufigsten vertreten.

Die Berechnungen der Aminosäurezusammensetzung beziehen sich auf das Gesamtmolekulargewicht des AT III.

| Aminosäure | mol Aminosäure / mol Glykoprotein AT III | | |
|---|---|---|---|
| | Koide (23) | Takahara (24) | eigene Analyse |
| ALA | 29,1 | 32,5 | 42 |
| ARG | 20,3 | 23,5 | 35 |
| ASP/ASN | 44,2 | 47,7 | 59 |
| CYS | 6,1 | 6,1 | 5 |
| GLU/GLN | 49,6 | 54,1 | 68 |
| GLY | 20,0 | 19,1 | 22 |
| HIS | 6,2 | 5,3 | 7 |
| ILE | 20,5 | 21,1 | 25 |
| LEU | 38,0 | 39,5 | 54 |
| LYS | 32,4 | 36,7 | 54 |
| MET | 10,9 | 10,9 | 4 |
| PHE | 24,1 | 33,7 | 32 |
| PRO | 23,1 | 21,9 | 12 |
| SER | 32,8 | 32,9 | 32 |
| THR | 23,4 | 25,5 | 36 |
| TRP | 3,8 | 6,3 | 15 |
| TYR | 10,1 | 7,3 | 10 |
| VAL | 28,9 | 27,5 | 25 |

Dieses Gesamtmolekulargewicht bezieht sich auf das Glykoprotein AT III, d. h. es gibt neben den Aminosäuren auch einen Saccharidanteil. Nach Borsodi (22) ist der Saccharidanteil im AT III variabel und von der Vorbehandlung abhängig. Es werden für den Saccharidanteil Werte von 10 bis 17 % angegeben (22,23,24).
Bei unterschiedlichen Isolierungsverfahren können verschiedene Formen des AT III vorliegen. Da das Isolierungsverfahren für AT III bei Koide aus meheren verschiedenen Schritten bestand, sind dabei mehr Veränderungen am AT III zu erwarten als bei dem hier vorgestellten Verfahren, bei dem nur eine Methode zur Reinigung des AT III verwendet wird .

## 5.2 Konzentrationsbestimmungen des AT III

Da es gelang AT III so weit zu reinigen, daß keine Verunreinigungen mehr mit den hier benutzten Methoden nachweisbar waren (Methoden siehe 3.3 bis 3.6), konnten vergleichende Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden. Mit der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung des Gesamteiweiß bei einer Wellenlänge von 280 nm konnte das AT III direkt gemessen werden, weil das AT III als Monosubstanz vorlag. Durch die Ergebnisse der Aminosäurentotalanalyse wurde es möglich, den spezifischen Extinktionskoeffizienten zu errechnen.
Gleichzeitig wurden Konzentrationsmessungen mit der radialen Immundiffusion durchgeführt. Die Eichkurve dazu wurde aus einer Verdünnungsreihe aus Standard- Human-Plasma erstellt.
Beim Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigte sich, daß die Konzentrationsmessungen mit der radialen Immundiffusion doppelt so hohe Ergebnisse lieferten als mit der Gesamteiweißbestimmung. Dieses Phänomen trat immer dann auf, wenn AT III weitgehend gereinigt war. Deshalb wurden die Meßergebnisse dieser Methode in arbitrarischen Einheiten angegeben (siehe Einleitung 1.2). Für die Konzentrationsbestimmungen von hochgereinigtem AT III mit radialer Immundiffusion muß man eine eigene Eichkurve erstellen, um Ergebnisse in Gramm je Liter zu erhalten.
Dieses Phänomen wird von Murano (11) beschrieben. Es stellt sich die Frage, wodurch das unterschiedliche Verhalten von gereinigtem und Plasma- AT III bei der Präzipitatbildung erklärt werden kann. Es werden bei der radialen Immundiffusion Agarplatten mit Antiseren verwendet, die gegen hochgereinigtes AT III gebildet waren. Die Ursache für das unterschiedliche Diffusionsverhalten muß in der Interaktion des AT III mit anderen Plasmabestandteilen gesucht werden. Bei Plasmaproben erfolgt eine Behinderung des AT III- Moleküls während

des Diffusionsvorganges im Agargel durch andere Proteine. Veränderungen am AT III werden nicht als Ursache anzusehen sein, da AT III im gereinigten Zustand seine biologische Aktivität behält und dies ein außerordentlich empfindlicher Parameter für Änderungen an Molekül ist. In einer internationalen Vergleichsstudie zur Erstellung einer Referenzpräparation für AT III von Kirkwood (25) wurden gefriergetrocknete Plasmen, Normalplasmen und gereinigtes AT III untersucht. Dabei konnte man zeigen, daß die Bestimmungen von gereinigtem AT III bei verschiedenen Methoden und Laboratorien sich stärker unterscheiden als bei Plasmaproben.
Die unterschiedlichen Eigenschaften des AT III, die als Testkriterien für die Bestimmungen verwendet werden, weichen verschieden stark vom Plasma- AT III ab. Die Resultate weisen darauf hin, daß die Bindungsfähigkeit für Heparin bei der Reinigung stärker beeinträchtigt wird als die Bindungsfähigkeit für Serylproteasen.

## 5.3 Interaktion von Faktor Xa mit AT III

In Hemmversuchen mit AT III und Faktor Xa sollte der entstehende Komplex aus beiden Proteinen nachgewiesen werden. Dazu wurden verschiedene Mischungsverhältnisse aus Faktor Xa und AT III gewählt. In verschiedenen Versuchen wurden entweder die Menge des Substrats oder die Menge des Enzyms konstant gehalten und der andere Reaktionspartner in seiner Menge variiert. Nach Rosenberg (13) ist die Reaktion zwischen AT III und Thombin bei Zugabe von Heparin nach 2 Minuten bereits weitgehend abgelaufen. Es wurden von uns 20 Minuten Inkubationszeit gewählt. Ohne Zugabe von Heparin ist die Reaktion wesentlich langsamer, es wurde dann 12 Stunden inkubiert. Die inkubierten Proben wurden zunächst elektrophoretisch untersucht. Die PAA- Elektrophoresen zeigten immer das gleiche Bild. Es stellten sich nur Banden dar, die auch

in den Ausgangssubstanzen Faktor Xa und AT III zu sehen waren. AT III lag als Monosubstanz vor, Faktor Xa war noch mit geringen Verunreinigungen behaftet. Bei der Auswertung der Elektrophoresen wurde dadurch die Identifizierung der Banden erschwert.

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die Inkubation von Faktor Xa und AT III für verschiedene Zeiten bei 37° C. Die Reaktion wurde dann mit Natriumdodecylsulfat (SDS) unterbrochen (siehe 4.3.4.2). Es schloß sich dann eine SDS- Elektrophorese an. Bei allen Versuchen war ein Komplex nicht sicher nachweisbar. Bei einer Inkubation von 7 Stunden kam bei einem Molekulargewicht von 80 000 eine Bande, die zusätzlich zur Faktor Xa- und AT III- Bande erschien. Dies entspricht dem Ergebnis von Rosenberg (13) nach einer Inkubationszeit zwischen 10 und 120 Sekunden. Eine exakte Molekulargewichtbestimmung des Komplexes oder eine Ermittlung des Bindungsverhaltens von AT III und Faktor Xa gelang mit dieser Methode nicht.

Nach hemmkinetischen Untersuchungen von Wüst et al. (19) lagen Angaben über das Ausmaß der Hemmung des Faktor Xa durch AT III von dem Mischungsverhältnis vor. Es war dadurch möglich, vor dem Versuch in Abhängigkeit von der Relation der Reaktionspartner zueinander zu bestimmen, welche Proteinfraktionen nach der Inkubationszeit zu erwarten waren.

Es ist bekannt, daß AT III und Faktor Xa im äquimolaren Verhältnis miteinander reagieren. Bei einer 40%igen Hemmung des Faktor Xa durch AT III wird auch nach langer Inbationszeit neben dem Komplex immer noch Faktor Xa nachweisbar sein. Das AT III ist bereits vollkommen gebunden, wenn noch Faktor Xa frei vorhanden ist. Da die Komplexbildung unter physiologischen Bedingungen irreversibel ist, verbraucht sich das AT III.

Bei einer 96%igen Hemmung des Faktor Xa durch AT III kann man davon ausgehen, daß etwa die gleichen Mengen AT III und Faktor Xa vorliegen und diese im äquimolaren Verhältnis miteinander reagieren. Es ist nach ausrei-

chender Inkubationszeit nur die eine Proteinfraktion des Komplexes zu erwarten.

In einem dritten Ansatz wurde die Menge des AT III gegenüber dem Versuch mit 96%iger Hemmung verdoppelt. Es lagen dann etwa doppelt so viele Moleküle AT III wie Moleküle Faktor Xa vor. Es erfolgt Komplexbildung, bis der gesamte Faktor Xa gehemmt ist. Nach der Inkubation liegt dann neben dem Komplex noch AT III vor.

Es sind in den drei Ansätzen drei Proteine zu erwarten: Faktor Xa, AT III und der Komplex aus beiden.

Die Versuche (siehe 4.3.2) zeigen, daß Heparin- Sepharose alle drei Proteine während einer Affinitätschromatographie binden kann. Die Desorption mit einem Salzgradienten erfolgte bei Natriumchloridkonzentrationen zwischen 0.15 und 1,50 mol/l.

Die Fraktionen erschienen in den drei Proben wie erwartet:

| | | |
|---|---|---|
| Probe 1 | 40 % Hemmung | Faktor Xa , AT III |
| Probe 2 | 96 % Hemmung | Komplex |
| Probe 3 | >99 % Hemmung | Komplex , AT III |

Faktor Xa ist am schwächsten an die Heparin- Sepharose gebunden und desorbiert als erstes der gebundenen Proteine. AT III ist am stärksten gebunden und desorbiert erst bei hohen Salzkonzentrationen. Der Komplex desorbiert zwischen den beiden Einzelproteinen:

| Substanz: | Desorption bei: |
|---|---|
| Faktor Xa | 0.17 mol/l NaCl |
| Komplex | 0.25 mol/l NaCl |
| AT III | 0,8 mol/l NaCl |

Alle drei Proteine verfügen über Heparinbindungsstellen. Faktor Xa hat nur eine sehr geringe Affinität zum Heparin. Bei der Komplexbildung verliert AT III einen großen Teil seiner Affinität zum Heparin. Das kann durch

die Konformationsänderung bei der Komplexbildung begründet sein.
Zusätzlich wurde beobachtet, daß Faktor Xa bei der Chromatographie auf Heparin- Sepharose seine biologische Aktivität verliert. Eine Bindung zwischen Faktor Xa und Heparin ist nach Walker (26) ohne Aktivitätsverlust möglich, so daß der Faktor Xa bei der Affinitätschromatographie durch die Desorbentien zerstört wird.

## 5.4 Thermodynamische Untersuchungen bei der Komplexbildung von AT III und Faktor Xa

Yue und Starr (27) beschrieben das thermokinetische Verhalten der Komplexbildung zwischen AT III und Thrombin. Die Komplexbildung ist eine exotherme Reaktion. Bei Anwesenheit von Heparin ist die Wärmefreisetzung geringer als beim Fehlen dieses Katalysators.
In den hier beschriebenen Versuchen wurde für Faktor Xa ein ähnliches Verhalten beobachtet. Mit steigender Heparinkonzentration bei sonst identischen Versuchsbedingungen sinkt die freiwerdende Reaktionsenergie.
Die Tabelle zeigt die eingesetzten Mengen an AT III und Heparin in Mol für die verschiedenen Ansätze. Das Molverhältnis dieser beiden Substanzen ist angegeben.

| AT III | | Heparin | | AT III : Heparin |
|---|---|---|---|---|
| U | nmol | U | nmol | |
| 1,25 | 2,4 | 0 | 0 | 1 : 0 |
| 1,25 | 2,4 | 1,25 | 0,556 | 1 : 0,23 |
| 1,25 | 2,4 | 2,50 | 1,111 | 1 : 0,46 |
| 1,25 | 2,4 | 5,00 | 2,222 | 1 : 0,92 |

1 U AT III = 1,92 nmol AT III (21)
1 U Heparin = 0,44 nmol Heparin (12)

Da der Druck im Reaktionssystem während der Reaktion immer gleich war, kann man aussagen, daß die Reaktionsenthalpie mit zunehmender Heparinkonzentration abnimmt. Die Summe der inneren Energien von AT III und Faktor Xa ist höher (kein oder wenig Heparin anwesend) oder gleich (Heparin und AT III etwa äquimolar) der inneren Energie des Komplexes. Wenn die Reaktion exotherm abläuft, dann steigt die Entropie. Wenn Heparin bei der Entstehung des Komplexes etwa äquimolar anwesend ist, bleibt die Entropie erhalten. Die Innere Ordnung des Komplexes erreicht bei Anwesenheit von Heparin ein höheres Niveau. (28) Die Unterschiede liegen in der Konformation des Komplexes. Von Villanueva (29) wurde eine Konformationsänderung des AT III durch Heparin beschrieben. Diese überträgt sich offensichtlich auch auf den Komplex.

## 5.5 Theorie der Wechselwirkung zwischen AT III und Heparin

Zu der Frage, ob Heparin mit AT III, den Serylproteasen oder beiden Molekülen reagiert, gibt es verschiedene Untersuchungen und Theorien (siehe Einleitung 1.4). Die Katalysatorwirkung des Heparin bedingt eine Konformationsänderung der Reaktionspartner, die dann zu einer Beschleunigung der Reaktion führt.
Nach Stürzebecher (16) und Goosen (30) bindet sich Heparin an die Serylproteasen und erhöht deren Affinität zu AT III. Rosenberg und Damus (9,31) sehen als Reaktionspartner für Heparin das AT III an.
AT III hat neben der Enzym- Bindungsstelle, an die sich die Proteasen binden, noch Lysin- und Tryptophanreste, die als Reaktionsort für das Heparin betrachtet werden. Die Enzym- Bindungsstelle besteht aus einer Arginin Valin- Brücke.
Die Lysinbindungsstellen für Heparin wurden zuerst von Rosenberg (9) beschrieben. Von Villanueva (32) und Blackburn (33) wird im AT III Tryptophan als wesentli-

cher Bestandteil der Bindungsstelle für Heparin beschrieben. Es wird mindestens ein Tryptophanrest im AT III- Molekül für die Heparinbindung postuliert. Diese Bindungsstelle ist unabhängig von jener für die Bindung der Serylproteasen an das AT III.
Villanueva fand (29), daß es verschiedene Konformationen des AT III- Thrombin- Komplexes gibt. Diese ist abhängig davon, ob Heparin an der Entstehung beteiligt war oder nicht.
Die Theorie, daß AT III einen spezifischen Bindungsort für Heparin hat, wird durch unsere Versuche (siehe Abschnitt 4.1.1.2) unterstützt. Bei der Affinitätschromatographie wird AT III über immobilisiertes Heparin an die Sepharose gebunden. über den Zustand des AT III in dieser Bindung liegen bisher keine Ergebnisse vor. Die übliche Desorption mit Natriumchlorid läßt keine Schlüsse auf die biochemischen Vorgänge zu, da sie unspezifisch abläuft.
Hier wurde eine Desorption mit der Aminosäure Lysin und den primären Aminen Diäthanolamin und Triäthanolamin durchgeführt. Mit beta- Alanin war das nicht möglich. Die ersten drei Substanzen können AT III aus seiner Bindung am Heparin der Sepharose verdrängen.
Die Desorption mit Lysin läßt sich nach den Untersuchungen von Rosenberg (9) erklären. Es ist anzunehmen, daß das AT III durch die steigende Lysinkonzentration kompetativ vom Heparin verdrängt wird. Man kann AT III mehrfach hintereinander an Heparin- Sepharose binden und wieder desorbieren. Die Bindung zwischen AT III und Heparin muß wegen der Katalysatorwirkung reversibel sein. Die Desorption von AT III mit Lysin zeigt im Elutionsdiagramm ein ähnliches Bild wie die Desorption mit Natriumchlorid.
Wenn man die primären Amine Diäthanol- oder Triäthanolamin zur Desorption bei der Affinitätschromatographie verwendet, dann unterscheidet sich das Elutionsdiagramm von dem bei Lysin- oder Natriumchloriddesorption. Es er-

scheinen insgesamt vier getrennte Fraktionen. In allen Fraktionen war AT III nachweisbar. Man kann daraus schließen, daß man mit den primären Aminen verschiedene AT III Fraktionen gewinnt. Es liegen verschiedene AT III-Typen vor, die sich unterschiedlich fest an Heparin binden. Borsodi beschreibt Mikroheterogenitäten des AT III (22), die u.U. solche Unterschiede bewirken können. Da das AT III aus einem Plasmapool vieler Blutspender isoliert wurde, können genetische Varianten des AT III gemischt vorgelegen haben. Trotzdem war das gewonnene AT III in der PAA- Elektrophorese homogen. Die genetischen Unterschiede müssen sehr gering sein, insbesondere da das Molekulargewicht des AT III auch beim Vorliegen von Varianten offenbar annähernd gleich ist. Schon die Elution von AT III mit Natriumchlorid zeigt eine asymmetrische Verteilung. Die Trennung ist jedoch nicht scharf genug, um verschiedene Fraktionen zu diskriminieren. Es bedarf weiterer Untersuchungen, ob die veränderte Desorption mit Di- und Triäthanolamin durch Veränderungen am AT III bewirkt wird oder die primären Amine tatsächlich nur eine bessere Auftrennung ermöglichen. Die Desorption mit Diäthanolamin und Triäthanolamin ist weitgehend gleich.

## 5.6 Einfuß der Serylproteasen auf die AT III- Heparin-Bindung

Die affinitätschromatographischen Versuche mit AT III-Faktor Xa- Komplexen auf Heparin- Sepharose (siehe 4.3.2) weisen darauf hin, daß AT III für Heparin und Serylproteasen unterschiedliche Bindungsstellen hat. Komplexe aus AT III und Faktor Xa (Serylprotease) lassen sich an die Heparin- Sepharose binden.
Da nach Stürzebecher (14) und Machovich (34) auch Serylproteasen Heparin binden können, ist es denkbar, daß Komplexe aus Faktor Xa und AT III entweder über

das AT III, über Faktor Xa oder über beide Anteile an das Heparin gebunden werden.
Es zeigte sich, daß die Komplexe von der Heparin- Sepharose schneller als AT III alleine desorbierten. Faktor Xa alleine wurde wiederum schwächer an die Heparin- Sepharose gebunden als der Komplex. Daraus ergibt sich für die Reaktion zwischen AT III und Faktor Xa folgende Konsequenz:
Die Affinität des Heparin ist für AT III am höchsten. Wenn bei Komplexbildung von AT III und Faktor Xa unter Beteiligung von Heparin noch freies AT III vorhanden ist, so dissoziiert das Heparin wieder vom Komplex und steht weiter als Katalysator zur Verfügung. Wenn kein AT III neben den gebildeten Komplexen mehr vorhanden ist, kann das Heparin u.U. an den Komplexen gebunden bleiben.

## 6. Zusammenfassung

1.: Die AT III- Isolierung aus Plasma mit der Affinitätschromatographie auf Heparin- Sepharose konnte weiter vereinfacht werden.

2.: Zwei neue Methoden, das Chromatofocusing und die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC), wurden zum Nachweis der Reinheit des isolierten AT III verwendet.

3.: Es wurde gezeigt, daß AT III bei der Affinitätschromatographie nicht nur mit Natriumchlorid, sondern auch mit Lysin und primären Aminen desorbiert werden kann.

4.: Vom hochreinen AT III wurde eine Aminosäurentotalanalyse erstellt.

5.: Es wurde ein unterschiedliches Diffusionsverhalten von hochreinem und Plasma- AT III bei radialer Immundiffusion beobachtet.

6.: Es zeigte sich, daß der Komplex aus AT III und Faktor Xa mit Hilfe der Affinitätschromatographie von den Reaktionspartnern isoliert werden kann.

7.: Themokinetische Untersuchungen zeigten, daß die Entstehung des Komplexes aus Faktor Xa und AT III durch die Anwesenheit von Heparin energetisch erleichtert wird.

## 7. Literaturverzeichnis

(1) Morawitz,P.: Die Chemie der Blutgerinnung
Ergebnisse d. Physiol. (1905)

(2) Schmidt,A.: Über den Faserstoff und die Ursache seiner Gerinnung
Arch. f. Anat. u. Physiol. (1861)

(3) Howel,W.H., Holt,E.: Two new factors in blood coagulation - heparin and pro- antithrombin.
Am. J. Physiol. 47:328-342 (1918)

(4) Quick,A.J.: The normal antithrombin of the blood and its relation to heprin
Am. J. Physiol. 123:712-719 (1938)

(5) Brinkhous,K.M., Smith,H.P, Warner,E.D., Seegers,W.H.: The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin
Am. J. Physiol. 125:683-687 (1939)

(6) Monkhouse,F.C., France,E.S., Seeghers.W.H.: Studieson the Antithrombin and Heparin Cofactor Activities of a Fraction Adsorbed from Plasma by Aluminium Hydroxide
Cir. Res. 3:397-402 (1955)

(7) Abildgaard,U.: Purification of Two Progressive Antithrombins of Human Plasma
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19:190-195 (1967)

(8) Abildgaard,U.: Highly Purified Antithrombin III with Heparin Cofactor Activity Prepared by Disc Electrophoresis
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21:89-91 (1968)

(9) Rosenberg,R.D., Damus,P.S.: The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin- Heparin Cofactor
J. Biol. Chem. 248:6490-6505 (1973)

(10) Miller- Andersson,M., Borg,H., Andersson,L.O.: Purification of antithrombin III by affinity chromatography
Thromb. Res. 5:439-452 (1974)

(11) Murano,G., Williams,L., Miller-Andersson,M. et al.:
Some properties of antithrombin III and its concentration in humann plasma
Thromb. Res. 18:259-262 (1980)

(12) Trobisch,H.: persönliche Mitteilung

(13) Rosenberg,R.D.: Biologic Actions of Heparin
Sem. Hematol. 14:427-439 (1977)

(14) Stürzebecher,J.: Role of heparin in the interaction of serine proteinases with antithrombin III
Acta. Biol. Med. Germ. 36:1893-1897 (1977)

(15) Trobisch,H., Klasing,K.H., Wüst,T., Richter,O.:
Zum Mechanismus der Inaktivierunng des Faktors Xa durch das progressive Antithrombin und den AT III-Heparin- Komplex
1. Kongreß für Blutgerinnung in Wien (1980)

(16) Stürzebecher,J.: Untersuchungen zur Reaktionsweise des Heparin
Fol. Haematol. Leipzig 104:731-739

(17) Rittinghaus,K., Franzen,K.H.: Neues Proteintrennungssystem mittels HPLC
Laborpraxis 3:128-134 (1981)

(18) Girolami,A., Sagggin.L., Boeri,G.: Factor X Assays Using Chromogenic Substrate S-2222
Am. J. Clin. Pathol. 73:400-402

(19) Wüst,T.: Zum Mechanismus der Inaktivierung des Faktor Xa durch das progressive Antithrombin und den Antithrombin- Heparin- Komplex
erscheint in Kürze

(20) Cooper,T.G.: Biochemische Arbeitsmethoden
Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981)

(21) Heimburger,N.: Antithrombin III/ Biochemische Wirkung
Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung (1980)

(22) Borsodi,A., Narasimhan,T.R.: Microheterogeneity of Human Antithrombin III
Br. J. Haematol. 39(1):121-127 (1978)

(23) Koide,T.: Isolation and Characterization of Antithrombin III from Human, Porcine and Rabbit Plasma, and Rat Serum
J. Biochem. (Tokyo) 86(6):1841-1850 (1979)

(24) Takahara,H., Sinohara,H.: Purification and characterization of rat plasma antithrombin III
Biochem. Biophys. Acta 612:185-194 (1980)

(25) Kirkwood,T.B.L., Barrowcliffe,T.W., Thomas,D.P.: An International Collaborative Study Establishing a Reference Preparation for Antithrombin III
Thromb. Haemost. 29/43:10-15 (1980)

(26) Walker,F.J., Esmon,C.T.: Interactions between heparin and factor Xa inhibition of prothrombin activation
Biochim. Biophys. Acta 585:405-415

(27) Yue,R.H., Starr,T., Gertler,M.: Changes in thermodynamic parameters in the inhibition of thrombin by bovine antithrombin III
Thromb. Haemost. 38:202 (1977)

(28) Barrow,G.M.: Physikalische Chemie - Thermochemie
Bohmann Vieweg, Teil1:158-180 (1979)

(29) Villanueva,G.B., Danishefsky,I.: Evidence for a heparin- induced conformational change on AT III
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74:803-809 (1977)

(30) Goosen,M.F.: Heparin and the inactivation of thrombin by antithrombin III
Thromb. Res. 17:293-294 (1980)

(31) Damus,P.S., Hicks,M.:Anticoagulant Action of Heparin
Nature 246:355-357 (1973)

(32) Villanueva,G.B., Perret,V.: Tryptophan Residue at the Heparin Binding Site in Antithrombin III
Arch. Biochem. Biophys. 203:453-457 (1980)

(33) Blackburn,M.N., Sibley,C.C.: The Heparin Binding Site of Antithrombin III
J. Biol. Chem. 255(3):824-826 (1980)

(34) Machovich,R. et al.: The influence of Heparin, NaCl and calciumchloride on the rate of the thrombin-AT III- reaction Thromb. Res. 15:821-834 (1979)

# LEBENSLAUF

Als Sohn des Kaufmannes Heinrich Rustige und seiner Ehefrau Gisela wurde ich, Heinrich Josef Rustige, am 18. Januar 1957 in Krefeld geboren.

Von 1964 bis 1968 besuchte ich die Grundschule Krefeld- Forstwald. Von 1968 bis 1973 war ich Schüler der Albert- Schweitzer-Realschule in Krefeld, welche ich mit der Mittleren Reife abschloß. Anschließend besuchte ich das humanistische Arndt-Gymnasium zu Krefeld, wo ich 1976 mein Abitur absolvierte.

Von 1976 bis 1983 studierte ich an der Universität Düsseldorf Humanmedizin mit der praktischen Ausbildung am Lehrkrankenhaus Krefeld. Den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung bestand ich im April 1983.